



TITLE:

哺乳類細胞における単一ヒト人工
染色体テロメア維持機構の解析(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

若井, 道仁

CITATION:

若井, 道仁. 哺乳類細胞における単一ヒト人工染色体テロメア維持機構
の解析. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18417>

RIGHT:

哺乳類細胞における
単一ヒト人工染色体テロメア維持機構の解析

若井 道仁

目次

要旨	1
略語集	3
第一章 序論	6
1-1 テロメアと染色体末端	7
1-2 サブテロメアとシス配列によるテロメア領域の制御	8
1-3 特定染色体に着目した解析	10
1-3-1 哺乳類細胞におけるテロメアの複製	10
1-3-2 テロメア蛋白質の結合分布	11
1-3-3 テロメア DNA の転写	12
1-4-4 人工テロメア形成ベクターの DNA 組換えによる 新規テロメア形成	13
1-5 微小核細胞融合法による人工染色体の細胞導入	14
1-6 本研究で行った微小核融合法	15
1-7 本研究の目的	16
第二章 材料と方法	17
2-1 細胞培養	18
2-2 微小核細胞融合法	18
2-3 蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	19
2-4 サザンハイブリダイゼーション	19
2-5 BAL31 感受性検定	21
2-6 染色体領域の複製時期の決定	21
2-6-1 細胞周期同調	21
2-6-2 BrdU 取り込み領域の決定	21
2-6-3 クロマチン免疫沈降	22
2-8 抗体	24
2-9 RNA の調製と RT-PCR および定量 RT-PCR	24
2-10 テロメア繰り返し配列を含む RNA の濃縮と ノザンハイブリダイゼーション	26
2-11 転写開始点の決定	27

2-12 RNA の細胞内分画	27
2-13 siRNA を用いた遺伝子ノックダウン	28
第三章 結果	29
3-1 ヒト人工染色体 (HAC#21) を保持する哺乳類細胞の作製	30
3-1-1 微小核細胞融合法 (MMCT) による HAC#21 の宿主細胞の変更	30
3-1-2 pBluescript 由来の DNA 配列は染色体末端を HAC#21 特異的に認識する	31
3-2 HAC#21 のテロメア領域は固有の複製時期をもつ	34
3-2-1 同調細胞への BrdU パルス標識による DNA 複製時期の決定	34
3-2-2 人工テロメア形成ベクター由来の配列は S 期中期に複製される	35
3-3 HAC#21 のテロメア近傍領域にテロメア蛋白質が局在する	38
3-4 HAC#21 のテロメアは特徴的な転写産物を生じる	42
3-4-1 HAC#21 テロメア DNA は人工テロメア形成ベクター由来の 特定の領域より転写される	42
3-4-2 HAC#21 のテロメアは数 kb にわたり転写される	46
3-4-3 HAC#21 のテロメアは RNA ポリメラーゼ II により生成する	47
3-4-4 HAC#21 のテロメア転写産物はスプライシングを受ける	49
3-4-5 HAC#21 のテロメア転写産物にはポリ A が ほとんど付加されない	51
3-4-6 HAC#21 のテロメア転写産物はクロマチンに結合する	53
3-4-7 テロメア蛋白質 TRF1 は テロメア領域における転写調節に関わる	54
第四章 考察	57
4-1 HAC#21 を用いた単一テロメア解析	58
4-2 人工テロメアの DNA 複製	58
4-3 HAC#21 の人工テロメアとテロメア結合蛋白質	59
4-4 HAC#21 の人工テロメアと TERRA	60
4-4-1 TERRA の転写開始機構	60
4-4-2 TERRA の成熟	61
4-5 今後の展望	62

参考文献	63
謝辞	71

要旨

真核生物の染色体末端は、テロメアと呼ばれる特殊なクロマチンを形成し、5'-TTAGGG-3'を単位とする繰り返し DNA と種々の結合蛋白質および非コード RNA からなる。哺乳類細胞には一細胞あたり多数のテロメアが存在し、それぞれが数から数十 kb の長さをもつ。つまり、テロメア繰り返し配列は染色体末端の解析指標として有用ではあるが、それは多数の異なる染色体・染色体軸上の位置を区別せず単純平均したものである。このため、特定のテロメアに着目することにより、テロメアの挙動の変化をより鋭敏に観測することができるものと期待される。

先行研究において、ヒト 21 番染色体をもつ DT40 細胞株に人工テロメア形成ベクターを遺伝子導入させ、DNA 相同組換えにより長腕を短縮させたヒト 21 番由来人工染色体 (HAC) が作製された。本研究では、微小核細胞融合法を用いて、HAC を、DT40 細胞から HeLa 細胞および NIH-3T3 細胞に導入した。このようにして得られた HeLa 細胞内のヒト 21 番染色体由来 HAC (HAC#21) は、薬剤による選択のない状態で、少なくとも 6 週間にわたって安定に維持された。

HAC#21 には、ヒト 21 番染色体長腕の短小化過程で、人工テロメア形成ベクター DNA 配列をもつ新規テロメアが形成されていることが期待されたが、種々の構造解析によってそのことを確認した。この新規テロメアでは、テロメア繰り返し配列と異所的 DNA 配列から構成されるため、部位特異的なプローブ配列を設計することが可能である。一般に、正常ヒト染色体のテロメア近接領域であるサブテロメアは、異なる染色体間で重複した配列をもち多型に富むため、部位特異的なプローブを設計することが困難である。そのため、HAC#21 は、人工テロメアの機能構造を詳細に解析するよい実験系を提供するものと考えられた。

HeLa 細胞において HAC#21 は、テロメア領域が S 期中期に同調して BrdU で標識され、また、テロメア蛋白質がテロメア近傍の非テロメア繰り返し配列に局在することを示唆するクロマチン免疫沈降シグナルを得た。さらに、TATA 配列に類似した配列をもつサブテロメア内の DNA 領域より始まりテロメア繰り返し配列に至る転写が起きており、その RNA ポリメラーゼ II による転写産物の多くは、ポリ A 配列をもたず、クロマチンに局在することを明らかにした。内在性のテロメアは、サブテロメア・テロメア繰り返し配列が転写されて TERRA (telomere-repeat-containing RNA) を生成することが知られているが、これらの

HAC#21 転写産物の特徴は TERRA と共通している。人工テロメアでは、内在性テロメアに認められるサブテロメア配列が存在しないため、テロメア繰り返し配列自身がシス配列として、複製、転写など自身の維持に必要な代謝過程を積極的に行わせるような機能があることが示唆された。

略語集

Abf1: ARS-binding factor 1
ADH5: alcohol hydrogenase 5
a.u.: arbitrary unit
5-aza-2'-dC: 5-aza-2'-deoxycytidine
bp: base pairs
BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine
cDNA: complementary DNA
CSK: cytoskeleton
CpG: cytosine guanine dinucleotide
CTD: carboxyl-terminal domain
DNA: deoxyribonucleic acid
dCTP: deoxycytidine triphosphate
DTT: dithiothreitol
dUTP: deoxyuridine triphosphate
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA: ethylene glyco-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FACS: fluorescence-activated cell sorting
FBS: fetal bovine serum
FISH: fluorescence *in situ* hybridization
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HAC: human artificial chromosome
kb: kilo base
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hChr: human chromosome
hnRNPA1: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
M: mol per liter
Mb: mega base
MMCT: microcell-mediated chromosome transfer
mRNA: messenger RNA
NEAT1: nuclear enriched abundant protein 1
NP-40: Nonidet P-40

nt: nucleotide
1C: 1 content
ORF: open reading frame
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PC-SM: penicillin-streptomycin
p: petit
PI: propidium iodide
5' RACE: 5' Rapid amplification of cDNA ends
Rap1: repressor activator protein 1
RNA: ribonucleic acid
RNAi: RNA interference
rpm: revolutions per minute
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
rRNA: ribosomal RNA
RT-PCR: reverse transcription-PCR
SDS: sodium dodecyl sulfate
Sir: silent information regulator
siRNA: small interference RNA
snRNA: small nuclear RNA
Sp1: specificity protein 1
SSC: saline-sodium citrate
TBE: Tris/Borate/EDTA
Tbfl: TTAGGG-binding factor 1
TE: tris-EDTA
TERRA: telomere-repeat-containing RNA
TPP1: TIN2/PTOP/PIP1
TRF1: telomeric repeat binding factor 1
TRF2: telomeric repeat binding factor 2
Tris: tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
U: unit
UV: ultra violet
WASH: Wiscott-Aldrich Syndrome family protein homolog

XIST: inactive X specific transcript

第一章

序論

1-1 テロメアと染色体末端

真核生物の線状染色体末端はテロメアと呼ばれる特殊な高次構造を形成し、末端領域の分解や融合から保護している。テロメア DNA は 5'-TTAGGG-3' 配列を単位として数から数十 kb にわたる直列反復構造（テロメア繰り返し DNA）をとる。グアニンに富む鎖（G 鎖）は最末端側で 50 から 200 nt の 3' 一本鎖突出をつくるため（G-tail）、相補鎖（シトシンに富む C 鎖、5'-CCCTAA-3' 繰り返し配列）は 5' 陥没末端として維持される。テロメア繰り返し配列にはシェルタリン複合体として知られる 6 因子複合体が結合し、それらは TRF1、TRF2、RAP1、TIN2、TPP1、POT1 である[1]。そのうち、二本鎖部分に TRF1 と TRF2 が、一本鎖部分に POT1 が直接に結合する（図 3-1A）。

自由端をもつテロメア DNA は、より染色体内部領域から到達する複製フォークによって半保存的複製を行うため、DNA 複製が完全には行われないことが知られている[2,3]。すなわち、上述のとおりテロメア DNA は配列の極性をもち、ラギング鎖合成により新生した C 鎖は、次の複製ではリーディング鎖合成の鋳型となり、G-tail 形成のためプロセッシングを受け陥没末端になる（図 1-1）。このとき、新生 C 鎖は RNA プライマー部分の置換・修復合成により成熟する岡崎フラグメントの連結体であり、5' 側最末端の岡崎フラグメントとテロメア最末端の間を新規に（*de novo*）C 鎖合成する機構が知られていない（ただし、別の見解を示唆する報告もある[4]）。このように、どちらの鎖においても短小化した新生鎖が次の DNA 複製の鋳型となるため、テロメアは細胞分裂回数に伴い短小化すると考えられる。実際にも、試験管内複製系においてテロメア短小化のモデルが示され[5]、細胞分裂寿命との関係も確立している[6,7]。

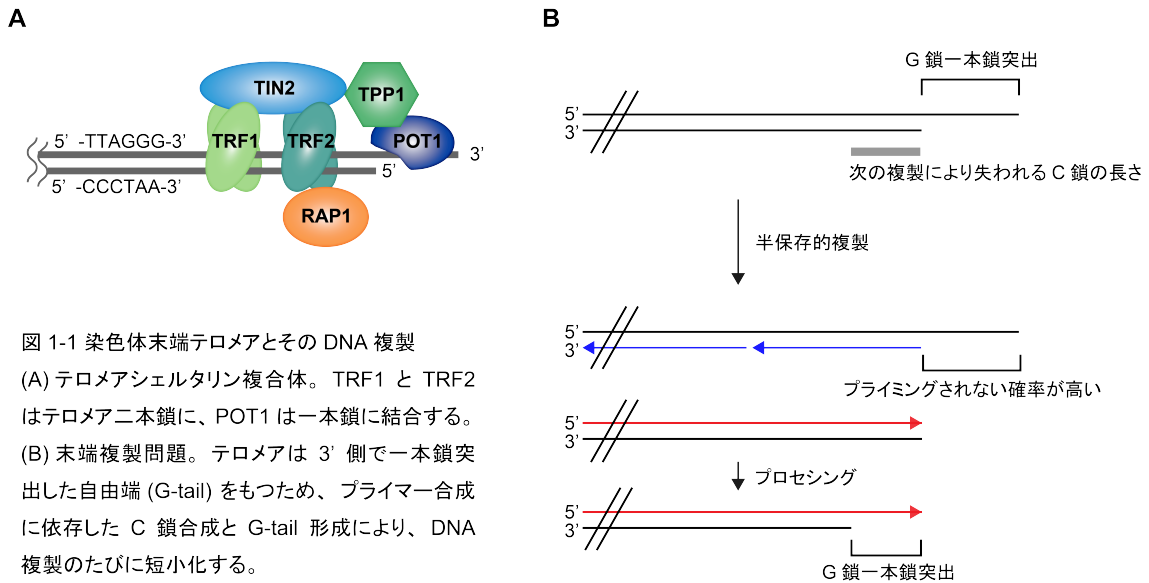


図 1-1 染色体末端テロメアとその DNA 複製

(A) テロメアシェルタリン複合体。TRF1 と TRF2 はテロメア二本鎖に、POT1 は一本鎖に結合する。(B) 末端複製問題。テロメアは 3' 側で一本鎖突出した自由端 (G-tail) をもつため、プライマー合成に依存した C 鎖合成と G-tail 形成により、DNA 複製のたびに短小化する。

一方で、多くのがん細胞、幹細胞および生殖細胞はテロメラーゼと呼ばれる逆転写酵素を発現しており、テロメラーゼに組み込まれたテロメア繰り返し配列をもつ鋳型 RNA をテロメア G-tail と相補対形成させ、これを伸長させることができる。従って、テロメア維持機構の解明は、テロメラーゼの作用の制御の観点から主になされてきた。

一般に、損傷・切断した一本鎖・二本鎖 DNA 末端は、DNA 損傷チェックポイントを活性化させ、DNA 末端結合反応や DNA 組換え反応をおこしうる。テロメアの生物学的な機能は、生理的な DNA 末端であるテロメア DNA がこれらの反応をおこさせないよう保護し、染色体上の遺伝情報を安定に維持することであると信じられている[8]。

1-2 サブテロメアとシス配列によるテロメア領域の制御

テロメア繰り返し配列に接する 500 kb の染色体領域はサブテロメアと便宜的に定義され (図 1-2)、巨視的な配列構造として一定の特徴を示すものの、塩基配列レベルでは染色体間および個体間で多型を示す。テロメア繰り返し配列に隣接して 5 kb から数十 kb の領域にサブテロメア繰り返し配列が存在し、その外側に分節重複配列と 1 コピーの配列が混在する[9,10]。塩基配列データベース上、1 kb 以上の長さで 90%以上の配列同一性を示す重複配列のうち、他のコピーが自他のサブテロメア領域に複数箇所存在するものをサブテロメア繰り返し配列、サブテロメア以外の領域に存在するものを分節重複配列と呼ぶ。さらに、反復

単位の単純な 5'-TTAGGG-3'類似配列などサテライト配列が、特にサブテロメア繰り返し配列の内部に多く散在しており、これらがテロメアに近いサブテロメアとその内側との境界を画するようにも見える。さらに、配列の重複や繰り返しのみならず、同じ染色体腕でもアシルによりそれらの配列のコピー数の点で配列構造が異なる[11]。以上のことから、特定の染色体についてのみ認識する特異的なプローブに適した塩基配列をサブテロメアに得ることが困難である。

興味深いことに、ヒトの個々の染色体にあるテロメア DNA は相同・非相同染色体を問わずそれぞれ固有の長さを示すことが知られる[12-14]。このこととサブテロメアの染色体特異的な構造には因果関係が疑われ、テロメア繰り返し配列近傍のサブテロメアにおいて、テロメア繰り返し配列長などテロメア代謝の定常状態を規定するシス因子の存在が仮定されるが[15]、テロメア繰り返し配列との機能分担はいまだ明確ではない。

出芽酵母においては、テロメア繰り返し配列に接して、順に複数個の Y'および 1 個の X と呼ばれるサブテロメア繰り返し配列が直列に存在し、シス配列としての機能を示す[16]。第一に、それら領域は複製起点をもち、酵母テロメア DNA の後期複製に関わる[17]。第二に、Y'配列はスプライシング配列をもつ二つの ORF を含む。一方は減数分裂時にのみ発現することからこの時期に相同配列を利用したテロメアの対合を促進するシス因子としての機能が考えられる。他方は RNA ヘリカーゼと相同な配列をもつ。後者の ORF 様配列は分裂酵母にも存在し、その内部にあるセントロメア辺縁部と相同な繰り返し配列が、この領域において RNAi 機構に依存したヘテロクロマチン形成に寄与することが知られる[18]。第三に、これらの領域には、強力なヌクレオソーム排除効果をもち Myb ファミリー転写因子である Abf1[19]や Tbf1[20] (5'-TTAGGG-3'を認識する)の結合配列が存在する。興味深いことに、出芽酵母のテロメアはヌクレオソームを欠き、サブテロメアのヌクレオソームとの間に DNase I に高感受性の境界領域をもつ[21]。このため、これら転写因子の結合はテロメア近傍領域でヌクレオソームの配置を指定し、テロメアに形成する特殊なクロマチンとの境界を定めている可能性がある。ただし、これらのサブテロメア繰り返し配列は酵母細胞中で染色体の維持に必須ではない[22]。

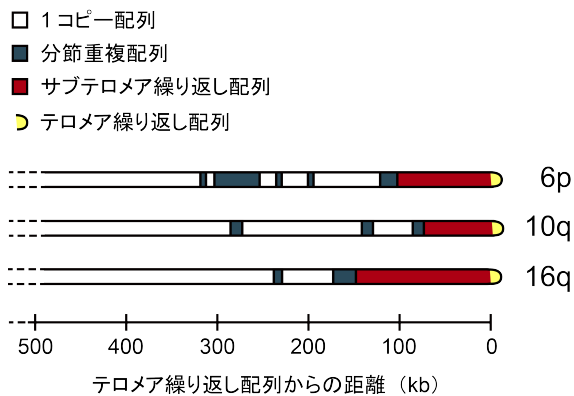


図 1-2 サブテロメアの配列構成の模式図

テロメア繰り返し配列から 500 kb 以内の領域はサブテロメアと定義される。テロメア繰り返し配列に接してサブテロメア繰り返し配列（数から数十 bp の縦列反復配列、トランスポゾン配列など）が存在し、その外側に他のゲノム領域との重複配列および 1 コピーの配列が存在する。テロメアの近くにはテロメア配列類似の配列が多く存在する。ヒト染色体 6p、10q、16q のサブテロメアについて、文献 9 より改変。p、q：染色体短腕、長腕。

1-3 特定染色体テロメアに着目した解析

哺乳類は一細胞あたり多数のテロメアをもち、それぞれのテロメアは数 kb から数十 kb にわたる長い繰り返し配列をもつ。さらに、その長さは染色体ごとに固有の平均値をもち、それぞれが細胞間での偏差を示す。この事実を敷衍して、任意のテロメアの性質について細胞の集団平均をとると観測ノイズの総和が増大する、すなわち観察統計量が平均まわりの正規分布ではないと予言できる（図 1-2、左）。対照的に、ある特定のテロメアに着目した場合にはその特定の平均値についての偏差のみを考慮すればよく、より鋭敏な観測が可能になると期待される（図 1-2、右）。また、テロメア DNA は繰り返し配列のため、任意のテロメア DNA を染色体軸に沿った特定の座標に整列することができない。一方、既知のサブテロメア配列をもつ 1 本のテロメアに着目すれば、プローブとするサブテロメア配列を起点に、そこからテロメア繰り返し配列への長さを位置情報としてとりだせると期待される。

以下の節では、上記の予想と適合すると思われる具体例を説明する。

1-3-1 哺乳類細胞におけるテロメアの複製

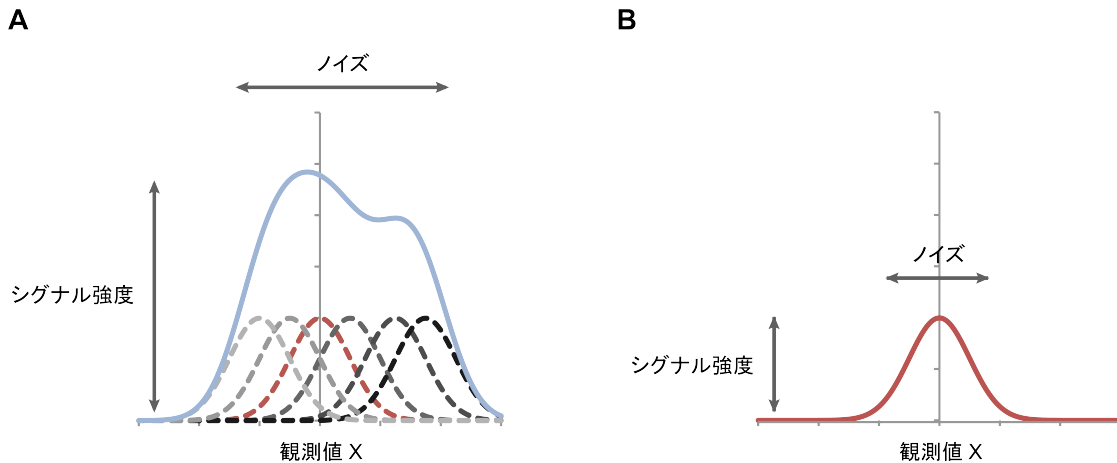


図 1-3 単一テロメア解析に予想される特徴

(A) 従来のテロメア解析における X の観測。個々のグラフは異なる染色体のテロメアを表し、細胞集団の統計値を調べると固有の平均値と偏差をもつことが分かる。水色のグラフは、細胞内のテロメア全体の寄与を足し合わせて検出したもの。

(B) 単一のテロメア（赤）に着目して観測した点を除いて A と同じ。シグナル強度（縦軸の値）は小さくなるが、ノイズ（平均値まわりのばらつき）は A に比べて明らかに小さい。

哺乳類細胞においては、個々の染色体腕に位置するテロメアは S 期においてそれぞれ固有の複製時期をもつように見えるため[23-25]、平均して S 期を通じたテロメア DNA の複製が観察される[26]。テロメラーゼは、毎回の細胞周期において個々のテロメアの半保存的複製直後に作用するという報告がなされており[27]、このことからテロメラーゼの作用機構を知る上で特定のテロメアに着目することが有用と考えられる[25]。一方で、テロメア DNA 配列への細胞周期にわたる蛋白質の結合・解離の時期と順序が報告されている[28,29]。これらの事象が個々のテロメアにおいていかに協調して起きているのかを知ることは、テロメア維持にとり必須のテロメアの複製を理解する重要なことであるため、より詳細な解析が必要となる。

1-3-2 テロメア蛋白質の結合分布

テロメア蛋白質はテロメア繰り返し配列のみならずその外側の領域まで局在を広げるとの報告が、出芽酵母 Rap1p および分裂酵母 Taz1 のクロマチン免疫沈降実験によりなされた。この現象はテロメア蛋白質のスプレッディングと呼ばれる[18,30]。さらに、両者はどちらもテロメア繰り返し配列に直接結合し、か

つ、ヘテロクロマチン蛋白質のサブテロメア領域への結合を可能にすることから、哺乳類細胞においても同様にテロメア蛋白質がヘテロクロマチン蛋白質を呼び込むのに必要との仮説が考えられた。しかし、テロメア DNA は繰り返し配列からなるため、染色体の軸方向に沿った蛋白質の結合分布を調べるには、特定の染色体のテロメアに着目する必要がある。テロメア直近の特定の領域を起点にとれば、テロメア繰り返し配列内部までの長さを測りとることができる。

1-3-3 テロメア DNA の転写

テロメアはヘテロクロマチンの一種であり、これまで、一般に転写不活性な染色体領域であると信じられていた。ところが、近年、テロメア DNA が RNA ポリメラーゼ II によりサブテロメアより転写され、TERRA (telomere-repeat-containing RNA) と呼ばれる非コード RNA を生成することが発見された[31,32]。興味深いことに TERRA はテロメアに局在し、テロメアクロマチンの構成因子として、あるいは転写に付随する現象として、テロメア構造の維持に関与することが示唆された[33,34]。

テロメアが DNA 複製により短小化して細胞老化もしくはがん化に至る過程では、これまで主に、短小化したテロメアが直接に染色体不安定化を誘発する役割が注目されて来た[35-39]。一方で、テロメア短小化の結果として、テロメア領域におけるヒストン修飾などクロマチン修飾が変化し、翻ってテロメアの維持に影響を与える可能性が示唆されている[40,41]。約半数の TERRA のプロモーターは CpG に富むサブテロメア繰り返し配列内部に存在することが知られ (15q 染色体の TERRA など)、その転写活性は DNA メチル化に感受性を示す[42]。また、テロメア長と TERRA の生成量がテロメアでのヒストン修飾の量を介して相関する[43,44]。逆に、TERRA はテロメアにおけるヘテロクロマチン因子の維持に関与することが示唆される[45,46]。以上のことから、TERRA はテロメア長とテロメア領域のクロマチン修飾の二つの制御を介在するフィードバック因子の候補として重要と考えられる。

しかしながら、個々のサブテロメアについての配列情報が欠けており、TERRA の転写制御とその機能についての理解は進んでいない。例えば、性染色体短腕の擬似常染色体領域から生成する TERRA (Xp-Yp TERRA) は CpG プロモーターに制御されておらず、転写開始点が未知である。

1-4 人工テロメア形成ベクターの組換えによる新規テロメア形成

複製起点をもつ線状プラスミド DNA の両端にテロメア繰り返し配列を加えて（人工テロメア形成ベクター）出芽酵母に遺伝子導入すると、ミニ染色体として自律的に複製・維持され、その最末端には出芽酵母のテロメア繰り返し配列が新たに付加されていた[47,48]。

同様に、クローン化したテロメア繰り返し配列を哺乳類細胞に遺伝子導入すると、低効率で、挿入されたテロメア DNA が新たな染色体末端を形成することが分かった（図 1-4A）[49-51]。挿入部位よりテロメア側に存在した染色体腕部の DNA すべてが欠失していたことから、挿入されたプラスミド DNA のテロメア繰り返し配列内部で二本鎖切断が生じ、その末端にテロメラーゼがテロメア繰り返し配列を付加することで安定なテロメアが確立したと考えられる。この方法を利用すると、テロメア繰り返し配列近傍に任意の標識配列（テロメアプラスミドにクローン化した配列）をもつ染色体を作製することができる。

本研究では、これとは対照的に、DNA 相同組換えにより人工テロメア形成ベクターを特定の染色体領域に挿入して作製された、ヒト人工染色体を用いる（図 1-4B）。

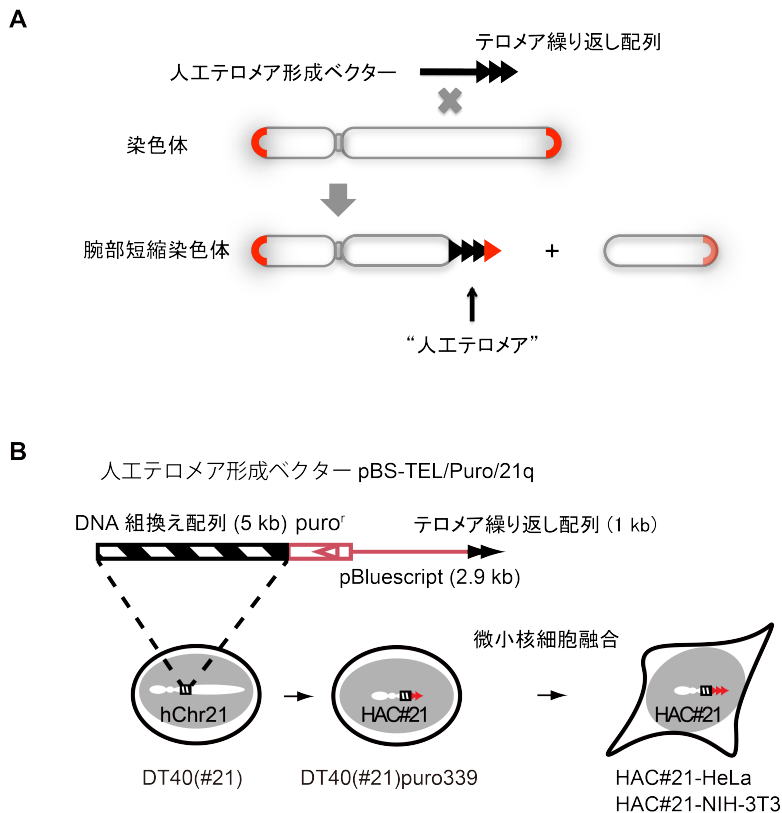


図 1-4 人工テロメア形成ベクターの挿入により作製されたヒト 21 番由来人工染色体 (HAC#21)

(A) テロメア配列の挿入による染色体の腕部の欠失。テロメア配列（黒い三角）をクローン化した線状プラスミド DNA が染色体の腕部に挿入されると、テロメア配列の内部で染色体が破断する。その結果、安定な短縮染色体（左）とセントロメアをもたない不安定な染色体断片（右）が形成される。短縮染色体は、テロメラーゼによりテロメア配列付加（赤い三角）を受けることで安定化する（“人工テロメア”）。

(B) 人工染色体の作製。ヒト 21 番染色体をもつ DT40 細胞である DT40(#21) に（左）、特異的な DNA 組換え配列（縞）とテロメア繰り返し配列をもつ線状プラスミド DNA（人工テロメア形成ベクター）を遺伝子導入することで、ベクター上のテロメア配列が新たな染色体末端を形成し、腕部の短縮された 21 番染色体 (HAC#21) が作製された（中央）。本研究では、HAC#21 を保持する哺乳類細胞を解析に用いるため、HAC#21 を微小核細胞融合法により哺乳類細胞である HeLa 細胞または NIH-3T3 細胞に導入し直した。

1-5 微小核細胞融合法による人工染色体の細胞導入

以下では、先行研究においてなされた、本研究が用いたヒト 21 番染色体由来人工染色体の作製過程について述べる[52]（図 1-4B）。B 細胞由来のニワトリ DT40 細胞は、高い DNA 相同組換え能力をもつ。そこで、まず、DT40 細胞に、微小核細胞融合法 (microcell-mediated chromosome transfer; MMCT)によりヒト 21

番染色体を融合した。この細胞に、DNA 組換え配列を付加した人工テロメア形成ベクターを遺伝子導入することで、それと相同なヒト 21 番染色体上領域へ特異的にそれを挿入することができる（図 1-4B、左）。DNA 組換えが起きた染色体をもつ細胞を、人工テロメア形成ベクター上の薬剤耐性遺伝子を用いて選択する（図 1-4B、中央）。以下の微小核細胞融合法により、薬剤選択遺伝子をもつ染色体を異なる宿主細胞へ移植することができる[53]。この方法は、M 期細胞が間期細胞の染色体に凝縮を促すことを示し、細胞周期研究に貢献した[54]。

1-6 本研究で行った微小核細胞融合法

本研究では、以下の微小核細胞融合法を用いて、薬剤選択遺伝子をもつ人工染色体を哺乳類細胞へと染色体導入した（図 1-5）[53]。

細胞を微小管重合阻害剤の colcemid で長時間処理すると、mitotic slippage を起こして細胞質分裂を行わずに核膜を再形成し、次の細胞周期の G1 期に移行するものが現れる。このとき、個々の染色体の周りに脂質膜が再形成される（微小核細胞）ので（左から 2 番目）、目的染色体を含む微小核を次のようにして細胞から回収する。アクチン重合阻害剤である cytochalasin B を colcemid 処理細胞に与えて核を外から包むアクチン繊維を破壊し、フラスコに付着させたまま細胞に遠心力をかけて脱核させる（図 1-5B）。脱核により得た微小核画分には宿主細胞塊の一部が含まれるためこれをフィルトレーションしたものを、細胞膜表面のシアル酸と親和性のあるヘマグルチニン溶液に懸濁し、ポリエチレングリコール（PEG）により細胞膜を表面処理したレシピエント細胞と融合後（図 1-5、右）、目的染色体をもつ微小核のレシピエント細胞を薬剤選択により選別する。

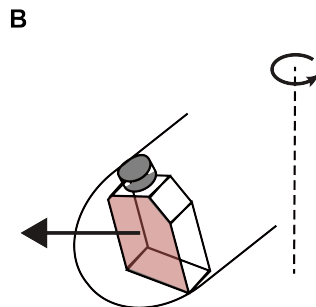
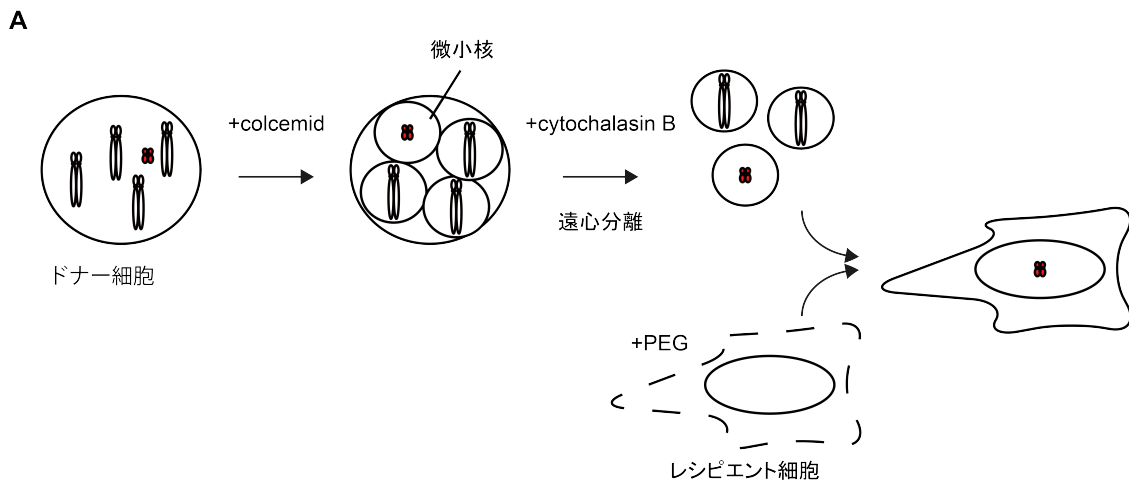


図 1-5 微小核細胞融合法による染色体導入

(A) ドナー細胞を colcemid で処理して mitotic slippage が起きた細胞は個々の染色体が脂質膜で包まれた微小核を形成する。このような細胞を cytochalasin B で処理してアクチン繊維を破壊し、遠心操作により微小核を単離する。精製した微小核を、PEG (polyethylene glycol) 処理を行ったレシピエント細胞と膜融合させることで、薬剤選択マーカをもつ目的の染色体をレシピエント細胞内へと導入する。

(B) 遠心による脱核操作。細胞付着面（着色面）を下にして、培地でみたしたフラスコを遠心桶に回転半径方向外向きに立てかけ、温浴中で遠心すると（回転矢印）、矢印の方向に力が加わり、アクチン繊維を破壊したドナー細胞から微小核が脱核する。

1-7 本研究の目的

これまで述べたように、特定のテロメアに着目することでテロメア維持機構のより詳細な解析が可能になることが期待される。ところが、それに必要なテロメア近傍領域の配列を一意的に決定することが上述のとおり困難であり、その解決を迫られた。そこで、本研究では、テロメア近傍に特異的に検出可能な塩基配列をもつヒト 21 番染色体由来人工染色体を保持する哺乳類細胞を作製し、そのテロメアの挙動を解析した。同時に、進化的に獲得した内在性サブテロメア繰り返し配列をもたないことがそのテロメア機能に影響を与えるか否かも検討した。

第二章

材料と方法

2-1 細胞培養

本研究では、既報のヒト 21 番染色体由来人工染色体（本研究では HAC#21 と呼ぶ）を保持する DT40-マウス A9 細胞異種融合細胞株である DT40(#21)puro339 を、微小核細胞融合のドナー細胞として用いた[52]。ヒト 21 番染色体を一本保持する DT40 異種融合細胞の DT40(#21)を用いて、ヒト 21 番染色体配列を組み込んだ人工テロメア形成ベクターである pBS-TEL/Puro/21q（図 1-3B）をヒト 21 番染色体長腕と DNA 組換えさせることで、HAC#21 が作製された。DT40 異種融合細胞株は、1% ニワトリ血清、10% 牛胎児血清 (FBS) (JRH Biosciences)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (Sigma)、ペニシリン-ストレプトマイシン (PC-SM) (Gibco)、0.3% puromycin を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (Invitrogen)を用いて、40°C、5% CO₂ 存在下で培養した。微小核細胞融合法により HAC#21 を染色体導入した HeLa および NIH-3T3 細胞とそれらの親株は、10% FBS および PC-SM を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)中にて、37°C、5% CO₂ 存在下で維持された。

2-2 微小核細胞融合法

以下の手順に従って[52]、 1×10^9 個の DT40(#21)puro339 細胞（ドナー細胞）より HAC#21 を 3×10^6 個の HeLa または NIH-3T3 細胞（レシピエント細胞）へと染色体導入した（図 1-4A）。まず、微小核の提供細胞である DT40(#21)を、0.05 μ M colcemid と 20% FBS を含む RPMI 培地で 12 時間培養し、微小核形成を誘導した。その後、colcemid 処理細胞を cytochalasin B (Sigma)を含む無血清培地に回収して poly-L-lysine (Sigma)で表面処理した培養フラスコ (Nunc) の底に付着させたのち、cytochalasin B を含む無血清培地で満たしたフラスコを、細胞接着面を下方外向きになるよう、温浴した遠心桶に立てかけて装填し（図 1-4B）、34°C、8,000 rpm にて 1 時間の遠心操作で細胞を押しつぶして脱核し、微小核を培地中に回収した。微小核を被移植細胞に融合するため、8 μ m, 5 μ m, 3 μ m のフィルター膜を順に通して微小核を精製したものを、0.05 mg/ml phytohemagglutinin P を含む DMEM 培地に丁寧に懸濁した。それを、47% ポリエチレングリコール (WAKO) で正確に 1 分間膜透過処理した付着培養のレシピエント細胞に滴下して、両者を膜融合させた。翌日から 0.5-1.5 μ g/ml puromycin 存在下で選択培養し、生存し

た細胞株を HAC#21 保持細胞の候補として解析した。

2-3 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH; fluorescence *in situ* hybridization)

M 期中期細胞標本は以下のように作製した。2-4 時間の 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (1 $\mu\text{g/ml}$) colcemid 処理によりメタ期に停止させた HeLa 細胞 (NIH-3T3 細胞) を回収し、低張液 (0.075 M KCl) に懸濁して 37°C で 15 分間温浴、膨潤させたのち、3:1 メタノール-酢酸溶液で固定し、スライドガラスに滴下して染色体を伸展させた。また、FISH 解析用間期細胞は以下の前処理を行った。カバーガラスに付着培養させた細胞を、0.1% Triton X-100 を含む CSK 緩衝液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 0.3 M スクロース) を加え氷上にて 5 分間前透過処理したのち、固定液 (3.7% ホルムアルデヒド、0.25% グルタルアルデヒドを含む生理的リン酸緩衝液) を用いて氷上で 10 分間固定し、さらに 0.5% Triton X-100 を含む CSK 緩衝液を加えて 5 分間の透過処理を行った。

核酸ハイブリダイゼーション反応は 37°で一晩行い、標識プローブを加えた反応液 (50% ホルムアミド, 2 \times SSC (0.3M NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0), 1 mg/ml salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate, 5 \times Denhardt's (0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin) を用いた。メタ期染色体標本に対しては、クローン化したヒト 21/13 番染色体セントロメア特異的な α -サテライト配列 p11-4[55] を鋳型に、ニックトランスレーションキット (Roche) により digoxigenin-dUTP で標識した。シグナルは rhodamine 標識抗 digoxigenin 抗体 (Roche) を用いて検出した。また、間期細胞に対してはビオチン標識したヒト 21/13 番染色体 α -サテライト配列をもつオリゴ DNA プローブ (5'-TGTGTACCCAGCCAAAGGAGTTGA-3'[56]) を用いた。ビオチンシグナルは biotin 標識抗アビジン D 抗体、Alexa488 標識 streptavidin を順に反応させ検出した。Hoechst33342 を用いて検体を DNA 染色したのち、褪色防止剤として Vectashield (Vector Laboratories) を加えて作製したスライド標本を、Delta Vision 顕微鏡 (Applied Precision) を用いて観察した。撮影した z 軸方向の画像シグナルのデコンボリューション解析には、SoftWoRx (Applied Precision) を用いた。

2-4 サザンハイブリダイゼーション

サザンブロットは以下のチャーチ法に従って行った[57]。細胞より抽出・精製したゲノム DNA の制限断片を、0.7% アガロース/0.5×TBE ゲル電気泳動にてサイズ分離し、ゲルを 0.28 M HCl または 0.4 M NaOH 溶液中において 10 分で 1 回または 15 分で 2 回震盪して順に脱プリン化およびアルカリ変性を行ったものを、毛細管現象を利用してアルカリ溶液 (0.4 M NaOH) 中でナイロン膜 (Hybond N⁺, Amersham) へと転写した。転写したナイロン膜と核酸は強度 0.12 J/m² の紫外線照射 (UV Stratalinker 2400, Stratagene) により架橋したのち、7% SDS, 0.5 M sodium phosphate (pH 7.2), 0.5 mM EDTA の溶液中で平衡化したものを、³²P で標識した DNA プローブと混和し、プローブ配列により適宜 55-65°C の間の温度で、一晩、震盪反応させた。ハイブリダイゼーション後にナイロン膜をよく洗浄し (1% SDS, 40 mM sodium phosphate (pH 7.2), 1 mM EDTA)、Typhoon 9400 (GE Healthcare) を用いて放射活性を検出した。

プローブ DNA の標識は、50 μCi の α³²P-dCTP 存在下で、キットを用いたランダムプライミング (Roche) により行った。プラスミド由来配列のプローブ作製には、クローン化したプラスミド DNA を鋳型に PCR 増幅した産物をアガロースゲルから精製したものか、もしくは、*Pgk-puro* 配列をクローン化した pBluescript II SK(+) プラスミド DNA から直接切り出した制限断片を用いた。ヒトゲノム中に存在する配列をプローブにするときは、ゲノム DNA を鋳型に得た PCR 産物をクローン化して塩基配列を確認したのち、切り出してアガロースゲル精製した制限断片を用いた。

PCR には以下のプライマー配列を用いた。

pBS-fwd: 5'-TCAAGCTTATCGATACCGTCGACC-3'

pBS-rvs: 5'-GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG-3'

21p-fwd: 5'-CTGGCACTCCTGCATAAACA-3'

21p-rvs: 5'-TCTGTGTTCCCCTTCTCTGA-3'

21q-fwd: 5'-AGAGCTCTCTTGCTTGAAGATTGG-3'

21q-rvs: 5'-CTTCATGGCACAGACTCTGCACAG-3'

2-5 BAL31 感受性検定

精製したゲノム DNA を 0.033 U/ μ l BAL31 (TaKaRa)と 30°C で 10 分間反応させ (600 mM NaCl, 12 mM CaCl₂, 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)、20 mM EGTA を加えて反応停止後にフェノール・クロロホルム抽出とアルコール沈殿により精製した DNA を、サザンハイブリダイゼーションにより解析した。

2-6 染色体領域の複製時期の決定

2-6-1 細胞周期同調

HAC#21-HeLa 細胞を 2 mM thymidine を加えた培地で 16 時間、通常培地に戻して 11 時間、1 μ g/ml aphidicolin を含む培地で 14 時間、順次培養して G1/S 期に細胞周期を停止させた。その後、保温した生理的リン酸緩衝液および培地で細胞を洗浄して薬剤を除いた時刻を 0 として、その後の特定の 1 時間のみ 50 μ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を添加した培地に替え、その他の期間は通常培地中で培養し、9 時間目に細胞を回収してゲノム DNA を抽出・精製した。

細胞周期進行を確認するため、50 μ g/ml ヨウ化プロピジウムを用いて氷上で 30 分間核酸染色した細胞の DNA 含量を、FACS Calibur (BD)を用いて調べた。

2-6-2 BrdU 取り込み領域の決定

精製ゲノム DNA をソニケーションにより 200-300 bp 程度の長さに断片化したうち 2 μ g をとり、BrdU で飽和標識した大腸菌から回収したゲノム DNA 2 ng をキャリアーDNA として加え、5 μ g の抗 BrdU モノクローナル抗体 (BMC9318, Roche)と 100 μ l の免疫沈降用緩衝液 (0.05% Triton X-100, 140 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.2) 中で室温にて 30 分間混和した。その後、20 μ l 相当の Dynal M-280 ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) 磁気ビーズを加えてさらに 30 分間混和し、回収したビーズを 5 回、500 μ l の免疫沈降用緩衝液により洗浄した。洗浄したビーズに 100 μ l の 1% SDS を含む TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)を加え、100°C で 3 分間加熱して共沈降 DNA を溶出し、除蛋白質後に DNA

を精製したものを、リアルタイム PCR 解析により定量した。反応は Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) 中で 95°C, 5 秒、60°C, 31 秒を 45 サイクル行い、ABI PRISM 7000 または StepOne Plus (Applied Biosystems) を用いた。

リアルタイム PCR 解析には以下のプライマー配列を用いた。

x-fwd: 5'-TCAAGCTTATCGATACCGTCGACC-3'

x-rvs: 5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGT-3'

z-fwd: 5'-GGCTTGTACTCGGTCATGGT-3'

z-rvs: 5'-CTTTCGACCTGCATCCATCT-3'

ADH5-fwd: 5'-GCATAATTGAGCCTACGCC-3'

ADH5-rvs: 5'-GCAGAGGTGTTTGTTACGTG-3'

γ -globin-fwd: 5'-TCTACCCATGGACCCAGAGGT-3'

γ -globin-rvs: 5'-CCACATGCAGCTTGTCACAGT-3'

2-7 クロマチン免疫沈降

既報を参考に、適宜改変を加えて行った[58]。トリプシン処理して数を数え、PBS (ニッスイ) 洗浄した 1×10^7 個の細胞を 10 ml PBS に懸濁し、終濃度 1% ホルムアルデヒドを加え転倒攪拌して固定した (23°C、10 分間)。蛋白質と核酸の架橋反応は終濃度 0.125 M グリシンを加えた室温 5 分間の反応により飽和させ、2 回 PBS 洗浄した固定細胞を、100 μ l のクロマチン抽出用緩衝液 (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, プロテアーゼ阻害剤カクテル Roche) により氷上で 10 分間抽出した。

以後の操作は特に断らない限り 4°C で行った。可溶化した固定クロマチンを、SDS を含まない 4 倍体積のクロマチン抽出緩衝液で希釈し、密閉式ソニケーター Bioruptor (BioRad) を用いて断片化した (出力 220 W で、ON 15 秒、OFF 15 秒のサイクルを 10 または 15 分間)。得られたクロマチン断片の遠心 (15,000 rpm、10 分間) 上清を、免疫沈降用緩衝液 (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2.5 mM KCl,

5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 7.6, 10% グリセロール, 1 mM DTT, プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche))により 10 倍希釈したものを、クロマチン免疫沈降のインプットとした。免疫沈降サンプルあたり 2×10^6 個の細胞由来の可溶化クロマチン断片を用い (1 ml)、抗体、および、40 μ l 相当の Dynal M-280 ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体または M-280 ヒツジ抗マウス IgG 抗体、または 80 μ l の M-450 ヒツジ抗ラット IgG 抗体磁気ビーズ (Invitrogen) を加えて、一晩混和反応させた。反応後の磁気ビーズを次の順でそれぞれ 5 分間混和洗浄した。1. 低塩濃度 NET 緩衝液 (0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0) 2. 高塩濃度 NET 緩衝液 (低塩濃度 NET 緩衝液の NaCl 濃度を 300 mM に変えたもの) 3. LiCl 緩衝液 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EGTA, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100) 4. TE。各洗浄回数は免疫沈降に用いた抗体の種類により適宜調節した。

免疫沈降したクロマチンは、洗浄後の磁気ビーズに 100 μ l の 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, TE を加え 68°C で 10 分間加熱することで溶出した。その後、溶出画分またはインプットに終濃度 300 mM の NaCl および 50 μ g/ml の RNaseA を加えて 200 μ l にしたものを、65°C で一晩加熱して脱架橋反応を行い、250 μ g/ml Proteinase K を加えて 56°C で一晩反応後にフェノール・クロロホルム抽出とアルコール沈殿を行い、DNA を精製した。

共沈降した精製 DNA を前節と同じくリアルタイム PCR 解析し、精製したインプットに含まれる DNA から標準曲線を描き、免疫沈降効率を計算した。

リアルタイム PCR 解析には以下のプライマー配列を用いた。

x-fwd: 5'-TCAAGCTTATCGATACCGTCGACC-3'

x-rvs: 5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGT-3'

y-fwd: 5'-TAAACAAATAGGGGTTCG-3'

y-rvs: 5'-TAACGCTTACAATTTAGGTG-3'

z-fwd: 5'-GGCTTGTACTCGGTCATGGT-3'

z-rvs: 5'-CTTTCGACCTGCATCCATCT-3'

w-fwd: 5'-AGGCCAGGAACCGTAAAAAG-3'

w-rvs: 5'-GATTTTTGTGATGCTCGTCA-3'

ACTG1-fwd: 5'-CTCTCGCACTCTGTTCTTCC-3'

ACTG1-rvs: 5'-GCTCACCGGCAGAGAAA-3'

2-8 抗体

クロマチン免疫沈降には以下の抗体を用いた。正常ウサギ IgG (Santa Cruz, sc-2027)、抗ヒストン H3 抗体 (Abcam, ab1791)、抗 TRF1 抗体 (当研究室の所有物)、抗 TRF2 抗体 (Millipore, #05-521, クローン 4A794)、抗 TPP1 抗体 (当研究室の所有物)、抗 RNA ポリメラーゼ II C 末端領域 (CTD) 抗体 (Abcam, ab5408, クローン 4H8)。抗リン酸化 CTD 抗体は以下の文献で特異性が報告されたものを用いた[59]。抗セリン-2 CTD 抗体 (クローン 3E10)、抗セリン-5 CTD (クローン 3E8)。

イムノブロットには以下を用いた。抗 nucleolin 抗体 (Abcam, ab13541)、抗チューブリン抗体 (Sigma, T3526)、抗 hnRNPA1 抗体 (Abcam, ab10685)、抗ヒストン H2B 抗体 (Millipore, #07-371)、抗 GAPDH 抗体 (Millipore, クローン 6C5)。

2-9 RNA の調製と RT -PCR および定量的 RT -PCR

核内 RNA として以下を用いた。6 cm 径の培養皿一枚から回収した細胞ペレットに 250 μ l の NP-40 低張緩衝液 (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 40 U/ μ l RNasin (Promega), 0.5 mM DTT) を加え、氷上で 10 分間抽出したものから遠心 (4°C, 500 \times g, 5 分間) 沈殿した核を回収し、NP-40 低張緩衝液で一回洗浄したものを材料として、以下の細胞全 RNA と同様に処理して RNA を抽出した。細胞全 RNA は、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出したものを、カラム上で DNase I 処理を行ったのち精製した。1 または 2 μ g の細胞内全 RNA、または核内 RNA 0.5 μ g を、AMV Reverse transcriptase XL (TaKaRa) と適切なプライマー (ランダム 9-mer、または遺伝子特異的プライマー) を用いて逆転写し、合成した cDNA を鋳型にリアルタイム PCR 解析 (Power SYBR Green PCR master mix, ABI) または PCR (LA-taq, TaKaRa) を行った。

遺伝子特異的な逆転写プライマーとして以下を用いた。

TERRA:

5'-TGCTCCGTGCATCTGGCATCCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA
-3' または 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA-3'

GAPDH: 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTGG-3'

U1: 5'-CATCCGGAGTGCAATGGATA-3'

NEAT1: 5'-GTTTAGAACTCAAACCTTTATTTGTGC-3'

XIST: 5'-GGAACAATGAAGAGCTTGAC-3'

RT-PCR または定量 RT-PCR の PCR プライマーには以下を用いた。

HAC-telRNA (全産物) fwd: 5'-TCAAGCTTATCGATACCGTCGACC-3'

HAC-telRNA (全産物) rvs: 5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGT-3'

HAC-telRNA (スプライス型 1) fwd: 5'-CTGCGCCTTATCCGTTGC-3'

HAC-telRNA (スプライス型 1) rvs: 5'-GATAAATCTGGAGCCGGTGA-3'

HAC-telRNA (スプライス型 1 および 2) fwd:

5'-GCGCTTTCTCATAGCTCACG-3'

HAC-telRNA (スプライス型 1 および 2) rvs:

5'-ACGACGGGGAGTCAGGCAACGG-3'

Xp-Yp TERRA fwd: 5'-CCCTCTGAAAGTGGACCTAT-3'

Xp-Yp TERRA rvs: 5'-GAGTGAAAGAACGAAGCTTCC-3'

15q-TERRA fwd: 5'-CAGCGAGATTCTCCCAAGCTAAG-3'

15q-TERRA rvs: 5'-AACCCCTAACCATGAGCAACG-3'

18S-fwd: 5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'

18S-rvs: 5'-ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA-3'

GAPDH-fwd: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'

GAPDH-rvs: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

c-Myc-fwd: 5'-CTCCTACGTTGCGGTCACAC-3'

c-Myc-rvs: 5'-CCGGGTCGCAGATGAAACTC-3'

NEAT1-fwd: 5'-GACTTGGGGATGATGCAAAC-3'

NEAT1-rvs: 5'-TCACAACAGCATACCCGAGA-3'

TRF1-fwd: 5'-TCCTCTGCCTCTCTCTTTGC-3'

TRF1-rvs: 5'-GGTTTTTCCTGCTGCAATTC-3'

U1-fwd: 5'-TACCTGGCAGGGGAGATACC-3'

U1-rvs: 5'-CATCCGGAGTGCAATGGATA-3'

WASH-fwd: 5'-AGCCAAGGTGGGGACTTGAT-3'

WASH-rvs: 5'-ACCAGCCCCAGGTCCTTTC-3'

XIST-fwd: 5'-AGCTTGACGTGTGGTGGTTG-3'

XIST-rvs: 5'-AGGTGGAGATGGGGCATGAG-3'

2-10 テロメア繰り返し配列を含む RNA の濃縮とノザンハイブリダイゼーション

細胞全 RNA 50 μ g と (CCCTAA)₅ 配列をもつビオチン化オリゴ DNA (5'-biotin-TGCTCCGTGCATCTGGCATCCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTA-3') 5 pml を、計 300 μ l になるように終濃度 10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA の緩衝液に調製した。この核酸溶液を 65°C で 2 分間の熱変性・氷冷したのち、10 μ g 相当の Dynal M-280 Streptavidin 磁気ビーズ (Invitrogen) を加えて室温で 1 時間混和した。磁気ビーズ-ビオチン化オリゴ DNA-RNA 複合体を各 5 分、3 回にわけ、300 μ l の洗浄緩衝液 (10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA) で洗浄した。洗浄後の磁気ビーズを、50% ホルムアミド、

1×Goldberg 緩衝液 (0.4 M Na-MOPS, pH 7.2, 50 mM sodium citrate, 5 mM EDTA) , 6% ホルムアルデヒドの溶液に懸濁して熱変性し、その 24/25 を変性アガロースゲル (1% Seakem GTG アガロース (TaKaRa)、6% ホルムアルデヒド、1×Goldberg 緩衝液 (0.4 M Na-MOPS, pH 7.2, 50 mM sodium citrate, 5 mM EDTA)) 電気泳動を行って RNA を分画した。残りの 1/25 は RT-PCR に用いた。電気泳動後、ゲルを 0.25 M 酢酸アンモニウム (pH 5.0) で中和し、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) によりマーカーを染色したのち、25 mM sodium phosphate (pH 6.5) 緩衝液中で Hybond H⁺ ナイロン膜に転写した。転写後のナイロン膜を紫外線照射により架橋したのち、pH 6.5 のリン酸塩緩衝液を用いて、チャーチ法により核酸ハイブリダイゼーションを行った。プローブには pBluescript 配列全長を用いた。

2-11 転写開始点の決定

0.5 µg の核内 RNA を鋳型に、SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) を用いて 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) を行った。pBluescript 配列の一部 (5'-GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG-3') をプライマーに用いて逆転写反応を行い、反応産物の一部を 95°C, 15 秒、60°C, 20 秒、72°C, 3 分を 45 サイクルの PCR に供した。

2-12 RNA の細胞内分画

細胞内分画の手順は、基本的には既報に従った[60]。1×10⁷ 個の細胞を 100 µl の細胞質抽出用緩衝液 (10 mM HEPES-KOH, pH7.4, 10 mM KCl, 0.34 M スクロース, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 U/µl RNasin) に懸濁した。そこへ、0.2% NP-40 を含む等量の細胞質抽出用緩衝液を加え、4°C で 5 分間混和した。その後、4°C, 3,800 rpm で 5 分間遠心し、その上清を細胞質画分 (Cyt) とした。その沈殿に 100 µl の核質抽出用緩衝液 (140 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, プロテアーゼ阻害剤カクテル, 0.5 mM DTT, 0.1 U/µl RNasin) を加えて懸濁したものを、Wheaton ホモジナイザーで 25 回ストロークして核膜を剪断破碎し、4°C で 20 分間混和したものの遠心上清 (4°C, 15,000 rpm, 5 分間) を核質画分とした (NP)。その沈殿画に 50 µl の DNase 消化溶液 (75 kU/ml DNase

I, 1×RDD 緩衝液 (Qiagen)) を加え 37°C で 1 時間反応させた。この遠心沈殿 (4°C, 15,000 rpm, 5 分間) にクロマチン抽出用緩衝液 (500 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, プロテアーゼ阻害剤カクテル, 0.5 mM DTT, 0.1 U/μl RNasin) を加え、4°C で 20 分間、塩抽出した上清をクロマチン画分 (Chr) とした。それぞれの画分に含まれる全 RNA を RNeasy Mini kit を用いて抽出・精製し、遺伝子特異的プライマーを用いて cDNA を作製した。個々に存在する RNA の割合は、リアルタイム PCR 解析により測定した。

2-13 siRNA を用いた遺伝子ノックダウン

ヒト *TRF1* 遺伝子に対する siRNA カクテル (Cosmo Bio, SHF27A-2210-C) または陰性対照のものを、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて 6-well プレートに蒔種した細胞に遺伝子導入した。その 48 時間後に細胞から細胞内全 RNA を抽出して RT-PCR を行い、増幅産物をアガロースゲルで分離して SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain により染色したものを、Typhoon 9400 および ImageQuant ソフトウェアを用いて定量した。

第三章

結果

3-1 ヒト人工染色体 (HAC#21)を保持する哺乳類細胞の作製

3-1-1 微小核融合法 (MMCT)による HAC#21 の宿主細胞の変更

本研究では、DT40 細胞にもたせた次のヒト 21 番染色体 (hChr21)由来の人工染色体 HAC#21 を用いた。既報のとおり、ヒト 21 番染色体長腕部 (ヌクレオチド 15,114,270-15,119,260、リファレンス配列 GRCh37.p10 を参照) に人工テロメア形成ベクターを組換えた結果[52]、元のヒト 21 番染色体 (48 Mb、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=21>) の 1/3 程度の約 15 Mb の大きさをもつ人工染色体 (HAC#21)が作製された (図 3-1A)。HAC#21 は、ニワトリ DT40 細胞内でピューロマイシン選択により維持されている (図 3-1A、左)。

ヒト 21 番染色体 (hChr21)由来の人工染色体 HAC#21 をもつ哺乳類細胞を作製するため、以下のドナー・レシピエント細胞の組で各 5 回の MMCT を行った。各回につき、 1×10^9 個のドナー細胞に対して 3×10^6 個のレシピエント細胞を用いた。HAC#21 は、ドナー細胞である DT40 由来のクローン DT40(#21)puro339 において薬剤選択下で保持されている[52]。細胞周期解析が容易と思われたヒト HeLa 細胞およびマウス NIH-3T3 細胞をレシピエント細胞に用い、それぞれ 3 および 38 クローンの puromycin 耐性クローンを得た (計 1.5×10^7 個のドナー細胞あたり、図 3-1A、右) (以下、それぞれ、HAC#21-HeLa および HAC#21-NIH-3T3 細胞と呼ぶ)。特に断らない限り、以降の解析は puromycin による薬剤選択なしに行い、また、HAC#21-HeLa を用いている。

ヒト 21/13 番染色体アルフォイド DNA を用いて FISH を行い、HeLa 細胞に導入した、HAC#21 と思われるミニ染色体が独立して存在することを確認した (図 3-1B)。

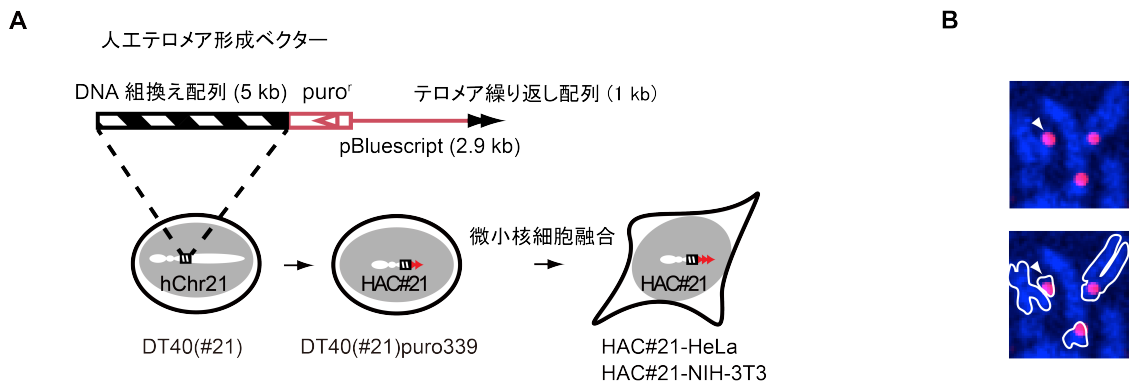


図 3-1 テロメア近傍に特異的配列をもつヒト 21 番由来人工染色体 (HAC#21, human artificial chromosome)

(A) 先行研究により作製されたヒト 21 番由来人工染色体の利用。ヒト染色体をもつ DT40 細胞ライブラリーの 1 つ (左、DT40(#21)) へ 21 番染色体配列 (縞) をもつ人工テロメア形成ベクターを遺伝子導入し、この細胞で高効率に起きる DNA 相同組み換えを利用してそれを 21 番染色体長腕の特定部位に挿入させた。ベクター上のテロメア繰り返し配列がそこで新たな染色体末端を形成したクローンを選んだ (中央)。この短縮 21 番染色体 (HAC#21) は、染色体腕部特異的にテロメアを識別する配列 (赤色の部位) をもつ。本研究では、哺乳類細胞のテロメアを解析するため、HAC#21 を微小核細胞融合法によりヒト HeLa 細胞またはマウス NIH-3T3 細胞に導入し直した (HAC#21-HeLa または HAC#21-NIH-3T3 細胞)。

(B) ヒト 21/13 番染色体アルフォイド DNA に対するメタ期染色体の FISH 像。細胞は、HAC#21 微小核細胞融合を行った HeLa クローン。矢頭は、HAC#21 と思われる独立したミニ染色体を示す。

3-1-2 pBluescript 由来の DNA 配列は染色体末端を HAC#21 特異的に認識する

HAC#21 において、人工テロメア形成ベクターが、DNA 組換え配列から予想される hChr21 長腕の位置に、その内部構造を保って染色体末端を形成しているならば、ベクターDNA がもつ特異的 DNA 配列をプローブに用いたサザンブロットにより予想長の断片のみを検出するはずである。そこで、HAC をもつ HeLa 細胞または対照 HeLa 細胞から精製したゲノム DNA を用意し、以下の条件を組み合わせて、HAC#21 特異的配列のプローブ (図 3-2、pBSa または pBSb) を用いたサザンブロットを行った。1.制限酵素処理の種類、および 2.制限酵素処理前の 10 分間の BAL31 処理の有無。BamHI はプローブ領域の近位側のみに認識配列をもつため、この処理において検出するテロメア繰り返し配列を含む断片は、細胞ごとの繰り返し回数のちがいを示すスミアシグナルを示すと予想される (図 3-2A)。一方で、HindIII はプローブ領域の両側にそれぞれ認識配列をもつため (図 3-2A、H)、ベクターの内部構造が維持されているなら 3.5 kb の断片を

検出すると期待される。

二本鎖エクソヌクレアーゼである BAL31 で精製ゲノム DNA を前処理すると、当該プローブ領域が染色体末端付近にある場合のみサザンブロットシグナルの移動度が速くなる（図 3-2A）[61]。

図 3-2B 上段の図で pBSa プローブが検出したシグナルは、対照細胞のレーン 1 にシグナルが見られず、HAC#21 特異的であった。このとき、BamHI 処理した左上図のレーン 2 ではスメア状のシグナルを検出し、このシグナルは BAL31 前処理により泳動度が下がった（レーン 3）。また、HindIII 処理した右上図において、人工テロメア形成ベクターの内部断片である約 3.5 kb のバンドを検出した（レーン 2）。このバンドは BAL31 処理陽性のレーン 3 において消失して見えたが、Chr21 短腕の染色体内部領域の配列を検出すると予想されるプローブ（図 3-2A、21b）の約 2.3 kb の検出バンドは泳動度の変化を示さなかった（レーン 2, 3）。なお、このときレーン 1 のバンドがより濃く検出されているが、他のレーンより泳動した DNA 量が多いためと考えられた。

以上より、BAL31 処理に高感受性を示した pBSa プローブ領域（図 3-2A、以下、pBluescript 配列）は、染色体末端付近に全長を維持して存在していることが強く示唆された。このことから、図 3-2A、レーン 2 で検出したテロメア繰り返し配列を含むスメア断片の長さ 5.2~10.2 kb よりサブテロメア配列にあたる 4.7 kb を引いて、HAC#21 のテロメア DNA は 0.5~5.5 kb の長さをもつと推定した。pBluescript 由来の配列が、単一 HAC#21 テロメアを特異的に認識するプローブ配列として利用可能であることが分かった。

次に、NIH-3T3 細胞に導入した HAC#21 のテロメア長を比較検討するため、BglII 処理したゲノム DNA を用いて、HAC#21 特異的な、テロメア DNA を含むことが期待されるスメアシグナルを検出した（図 3-2C、pBSb プローブ）。上と同様に、図 3-1C で検出したテロメア繰り返し配列を含むと思われる 7~11.6 kb の断片からサブテロメア部分の長さ 3.5 kb を引くことで、この細胞において HAC#21 のテロメア DNA は 3.5~8.1 kb の長さをもつと推定した。

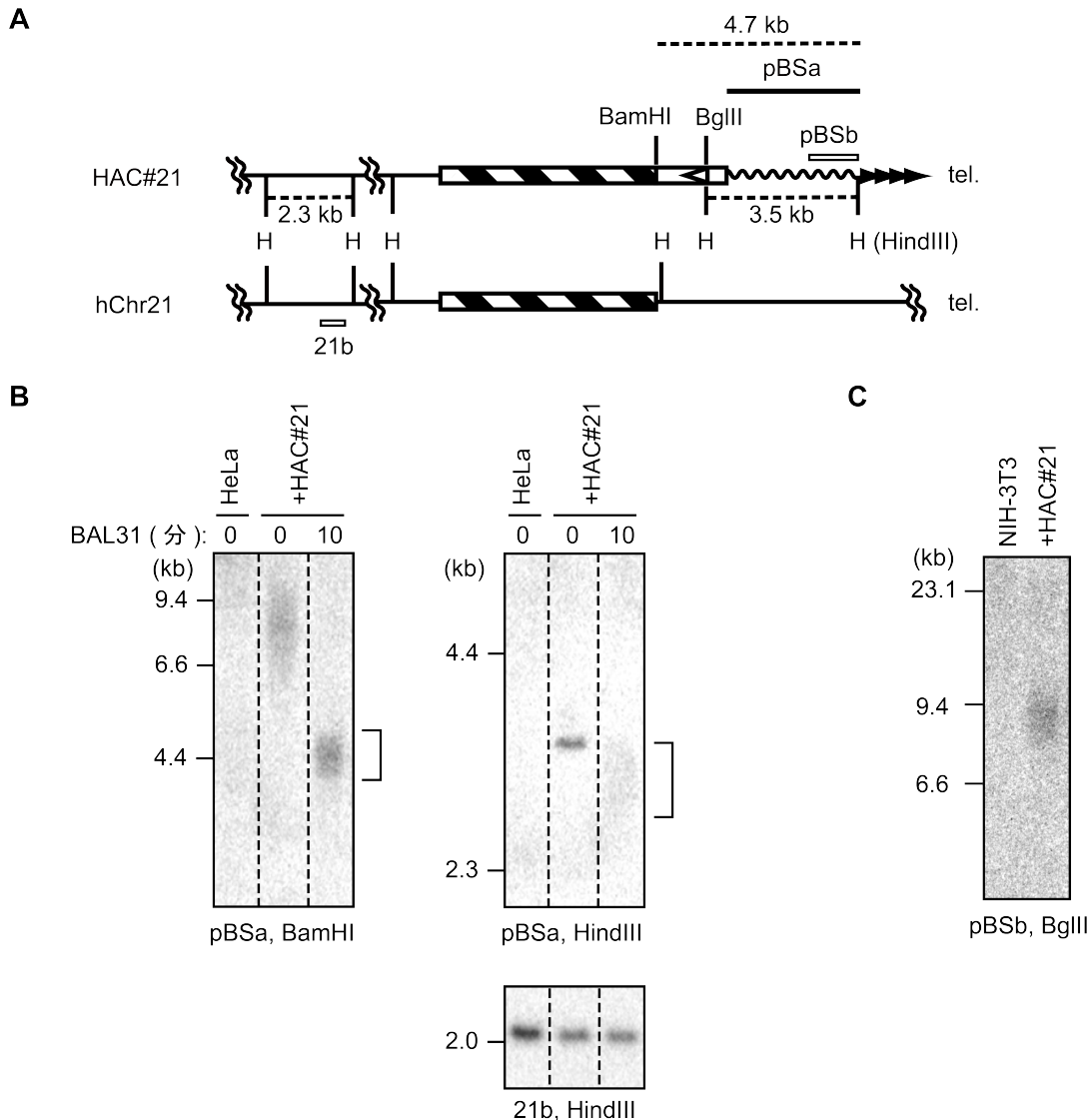


図 3-2 HAC#21 の単一テロメアのサザンブロットによる検出

(A) 人工テロメア形成ベクターの予想挿入領域付近の HAC#21 DNA 構造。B、C で用いるサザンブロットプローブの位置を示す (pBSa、pBSb、21b)。波線はベクター由来の配列。

(B) 人工テロメア形成ベクターの内部構造と染色体上の位置。細胞ごとに異なる回数のテロメア繰り返し配列をもつ染色体末端由来と予想される BamHI 断片 (左上)、およびベクター内部配列の HindIII 断片 (右上) は、ゲノム DNA の 10 分間の BAL31 エクソヌクレアーゼによる前処理 (10) に、スミアシグナルの移動度の変化として観察される感受性を示した (鉤括弧)。一方で、hChr21 の短腕側テロメアから約 11 Mb に位置する HindIII 断片 (左下) は BAL31 処理に非感受性であった (21b によるリプローブ検出)。テロメア繰り返し配列までの距離をスミアシグナルから差し引くことで、この HeLa クローン (+HAC#21) において HAC#21 のテロメア長は 0.5 から 5.5 kb と推定される。破線はレーンの区分を示す。

(C) NIH-3T3 クローン (+HAC#21) における HAC#21 のテロメア長。BglII 認識部位のテロメア配列からの距離をスミアシグナルの移動度から差し引くことで約 3.5 から 8.1 kb と推定される。

3-2 HAC#21 のテロメア領域は固有の複製時期をもつ

個々の染色体腕のテロメアはそれぞれ S 期のある特定の時刻に DNA 複製を受けることが知られており [23,24,26]、HAC#21 のテロメアについても同様に、固有の DNA 複製時期をもつことが期待される。テロメア複製時期の決定方法として、FISH 法により姉妹染色分体上の空間的に離れた 2 つのシグナルを検出する時期の同定、BrdU で短時間標識した新生鎖テロメア DNA の定量等が報告されている。

以下では、S 期に同調培養した HAC#21-HeLa 細胞に thymidine の BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) を特定の時刻にパルスで与え、人工テロメア形成ベクター由来の領域において DNA 複製が起きる時期を、BrdU による標識効率として検討した。BrdU は、培地に加えると速やかに細胞に取り込まれ、ハロゲン化ヌクレオチドであり直接 DNA 合成に使われるため、BrdU で標識された染色体領域はパルス時刻に DNA 複製を行ったものと考えられる。

3-2-1 同調細胞への BrdU パルス標識による DNA 複製時期の決定

細胞内の dNTP の濃度は正確に制御されており、その平衡の変化により S 期細胞は DNA 合成を止める。ヌクレオシドである thymidine は細胞に取り込まれるとリン酸化され dTTP になるため、過剰量の thymidine 添加により S 期以外に存在した細胞は次の S 期に進入後に速やかに DNA 複製を中断し細胞周期停止する。次に、通常培地に戻して培養すると、すべての細胞は DNA 複製を再開して S 期を通過する。この時刻に、同様に dCTP の DNA ポリメラーゼ α への取り込みを特異的に阻害する aphidicolin を培地に加えると、細胞は次の S 期進入直後に細胞周期停止する。両薬剤の効果は可逆的であるため、2 回の薬剤処理後に G1/S 期に細胞集団を濃縮できる。

そこで、増殖細胞に DNA 複製を阻害する過剰量の thymidine と aphidicolin を逐次処理して G1/S 期停止細胞を濃縮したものを、通常培地に戻して（この時刻を 0 時間とする）S 期への同調進行を促した。aphidicolin を除いてから経時的に細胞の一部を回収し、固定して DNA のインターカレーターである PI (propidium iodide) により染色を行いその DNA 含量をフローサイトメトリーにより測定した (図 3-3A)。0 時間で見られた 1C の単峰ピークは大部分が経時的に 2C へと移

動し、9 時間で再び 1C のピークが顕著に観察された。このことから、S 期の細胞周期進行は同調的に起きたことが分かり、また時刻 9 時間において細胞は S 期を完了していると考えられた。

N を 1 から 9 までの整数として時刻 N-1 から N 時間までの 1 時間のみ BrdU を加えた培地で培養し、以後、9 時間目にゲノム DNA を抽出するまで通常培地で培養した。各 N 時間目の時刻の直前 1 時間に複製された DNA 領域を次のように解析した。複製され BrdU を取り込んだ DNA 領域を濃縮するため、精製したゲノム DNA をソニケーションにより数百 bp まで断片化したのち、抗体が塩基を認識できるように熱変性して二本鎖を解離させ、抗 BrdU 抗体で免疫沈降した。沈降産物に含まれる各染色体領域の量を定量 PCR 法により測定し、時刻に対して表示した (図 3-3B)。ADH5 および γ -globin の遺伝子領域は、それぞれ早期および後期複製として知られているため、複製時期決定実験の陽性対照として用いた[62,63]。ADH5 は時刻 2~3 時間に、また、 γ -globin は 5-6 時間に BrdU 取り込みの極大を呈した。この結果と、いずれの領域についても S 期において BrdU の取り込み時期が極大となる時刻は一つであったことから、上述の実験手法によって求めた BrdU 取り込み時期は、染色体領域の複製時期と強い相関があることが分かった。

3-2-2 人工テロメア形成ベクター由来の配列は S 期中期に複製される

前節の実験で取得した同一の検体をもとに、pBluescript 配列を定量 PCR のプライマーに用いて解析した。図 3-2C に示す通り、領域 x と z は、人工テロメア上においてテロメア繰り返し配列からの距離がそれぞれ約 0.1 kb (テロメア繰り返し配列から 1 bp と 152 bp の間) と約 3.5 kb (テロメア繰り返し配列から 3,442 bp と 3,503 bp の間) の位置にある。テロメア繰り返し配列内部では通常、複製起点の形成・発火が起きず、サブテロメアの複製起点より発した複製フォークがテロメアに到達すると考えられている。このことと複製フォークの進行速度とを考慮すると、上記のテロメア近傍領域が複製される時期は HAC#21 のテロメア複製時期とほぼ同一と見なすことができる。

領域 x、z とともに、時刻 4~5 時間の 1 時間に BrdU の取り込みが最大であった (図 3-3B)。このことから、HAC#21 においてもテロメアは固有の複製時期をもつ可能性が考えられた。そこで、細胞集団において BrdU の取り込み積算値を各領域について求め、染色体領域ごとに表示することで、決まった時刻までに取り込

まれた BrdU の相対量を、時刻 0 から 9 時間までの積算値を 1 として時刻に対して表示した (図 3-3C)。上述のように、時刻 9 時間においてほとんどの細胞の DNA 含量が 1C であることから、この時刻で細胞は S 期をすでに終え次の細胞周期に移行していると考えられた。グラフは全てシグモイド曲線 (実線) により近似され、これらの染色体領域は特定の時期に BrdU の取り込みがあったことから、決まった複製時期をもつという仮説を支持する。また、HAC#21 テロメア近傍領域 x と z は、どちらもほぼ同一の曲線を描くとともに、曲線の変曲点での接線の傾きが、ADH5 のそれと同程度であった。これらは同じ同調細胞から得た結果であること、早い時刻の方が細胞の同調効率が良いと考えられることから、領域 x、y においても複製時期の細胞間でのばらつきは同等に小さいと考えられた。

以上の結果より、人工テロメア形成法により新規に形成した HAC#21 のテロメアも、HeLa 細胞において内在性のテロメアと同じく固有の複製時期をもつことが示唆された。

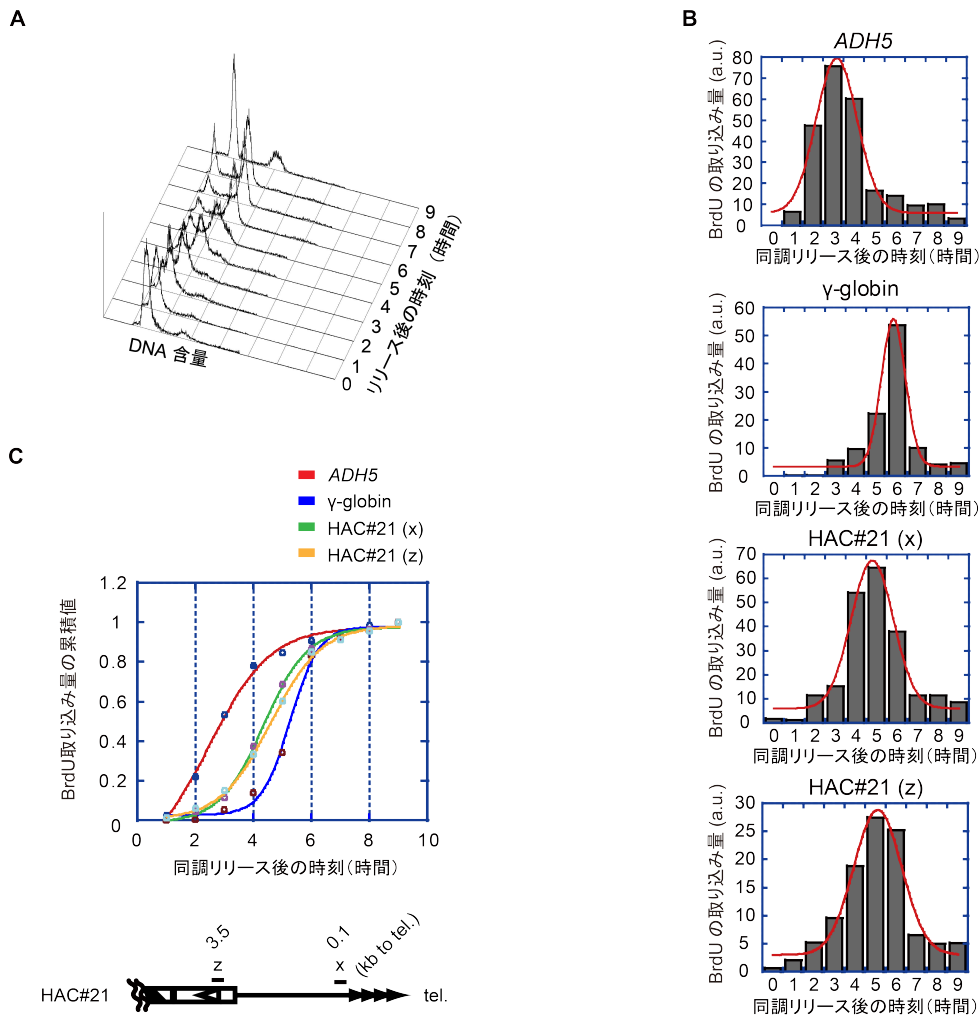


図 3-3 HAC#21 のテロメア領域は固有の複製時期をもつ

(A) S 期同調細胞周期進行のフローサイトメトリー解析。thymidine-aphidicolin ブロックにより G1/S 期に停止した HAC#21 保持 HeLa 細胞を、aphidicolin 除去 (0 時間) 後に同調して S 期を進行させた。経時的に分取して固定した細胞を propidium iodide 染色し、細胞の DNA 含量を測定した。

(B) BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) により標識した DNA 合成時期の領域ごとの比較。横軸に示した時刻の直前一時間において BrdU を S 期同調細胞培養培地に加え、新生鎖に取り込まれた BrdU の量を抗 BrdU 抗体により免疫沈降して定量した。異なる染色体領域において、特定の時刻に BrdU の取り込み量 (a.u., arbitrary unit で示す) が極大値を示したことから、固有の複製時期をもつことが示唆される。曲線はガウス近似を示す。

(C) 複製時期の決定。縦軸は、横軸の時間までに細胞集団が取り込んだ BrdU の累積値を示し、グラフの傾きは複製時期と細胞の同調率の両方を反映すると考えられる。早期複製であると知られるアルコール脱水素酵素 5 遺伝子のイントロン 1 の領域 (ADH5)、HAC#21 のテロメア近傍配列 (x および z、下図参照)、後期複製であると知られる G-γ-globin 遺伝子のエクソン 2 の領域 (γ-globin) は同調 S 期において特異的な BrdU 取り込み時刻を示し、それぞれ、早期、中期、後期複製であることが示唆された。曲線はシグモイド近似を示す。

3-3 HAC#21 のテロメア近傍領域にテロメア蛋白質が局在する

本節では、人工テロメア近傍に位置する pBluescript 由来の配列を用いて同領域にわたる蛋白質結合の様子を検討した。先に述べたように、テロメア蛋白質はテロメア DNA 上にシェルタリンと呼ばれる安定な 6 因子複合体として存在する[1]。シェルタリン蛋白質が HAC#21 のテロメアに局在することを検証するために、クロマチン免疫沈降法による解析を行った (図 3-4)。

クロマチン免疫沈降に用いる抗体がテロメア結合蛋白質を認識することを確認するため、クロマチン免疫沈降物に含まれる DNA を精製し、テロメア繰り返し配列またはヒト 21 番・13 番セントロメアのアルフォイド DNA を認識するプローブ (hChr21/13 アルフォイド) を用いてスロットブロットにより検出した (図 3-4A)。テロメア蛋白質 (TRF1、TRF2、TPP1) に対する抗体を用いた場合はテロメアプローブのみで、対照として用いた抗ヒストン H3 抗体ではいずれのプローブでもシグナルを得た。このことから、用いた抗体はテロメア蛋白質を特異的に認識していると考えられる。

次に、HAC#21 のテロメア領域への蛋白質結合を特異的に検出するため、HAC#21 特異的な pBluescript 配列を用いた定量 PCR により共沈降した DNA を解析した。テロメア繰り返し配列から異なる距離にある領域 (テロメア繰り返し配列のうち最もセントロメア側にある塩基からの距離が、1~152 塩基、623~700 塩基、3,442~3,503 塩基であり、それぞれ、図 3-4B の x、y、z) に、それぞれ特異的なプライマーを設計した。

クロマチン免疫沈降法により蛋白質の結合分布を調べる際に、抗体により免疫沈降するクロマチンに含まれる DNA 断片の長さが、検出感度や分布の誤差 (解像度) の観点から重要となる。そこで、ホルムアルデヒド架橋しソニケーション操作により得たクロマチン断片から DNA を精製し、それをアガロースゲル電気泳動により分離して、DNA 断片の鎖長を調べた。本節で用いる免疫沈降実験のインプットに含まれる DNA は、中央値が 0.2~0.3 kbp 程度でほぼ 0.5 kbp 以下に収まる鎖長をもつことが分かった。領域 x、y、z の定量 PCR 増幅配列は各 152 bp、78 bp、62 bp であり、ここで DNA 断長を 0.5 kbp までと仮定すると、それぞれのプライマーを用いて検出する蛋白質結合領域は、テロメアから各々 ~0.5 kb ($\sim 0+0.5$ kb)、0.2~1.1 kb ($0.700-0.5$ kb~ $0.623+0.5$ kb)、3.0~3.8 kb

(3.503-0.5 kb~3.442+0.5 kb)の領域と推測された。また、クロマチン免疫沈降において、理想的にランダムな位置で切断を受け解析領域の両側で均等に DNA 断片が分布するときには、免疫沈降の効率が目的蛋白質の相対的な結合量を表すとみなすことができる。実際には、ヌクレオソーム上の位置などによって DNA 断片の得やすさに局所的な差があると思われ、ランダムに切断した DNA 断片長が十分短く、抗体が大過剰に存在する場合には近似的にこれが成り立つと考えられる。

以上を踏まえて、上記の抗体を用いて免疫沈降したクロマチンと共沈した DNA を解析した (図 3-4B)。すべての抗体についてテロメアに最も近傍 (テロメアから 1~152 塩基)の領域 x で顕著なシグナルを得た。これは、HAC#21 のテロメア繰り返し配列にテロメア蛋白質が局在していることを示唆する。一方、テロメアから 623~700 塩基離れた領域 y において、抗 TPP1 抗体との共沈 DNA 量がほぼ消失したのに対して、抗 TRF1、および抗 TRF2 抗体との共沈 DNA 量は領域 x での値に比べてかなり減少したが有意に検出され、抗ヒストン H3 抗体と共沈した DNA の量はおよそ領域 x から半減していた。テロメアから 3.5 kb 離れた領域 z (3,442~3,503 塩基) においては、TRF1、TRF2、TPP1 の全てとの共沈 DNA が検出できなかった一方で、ヒストン H3 との共沈 DNA 量は領域 y に比べて増加していた。上述のように、領域 y はテロメア繰り返し配列から 0.62 kb 離れており、共沈 DNA 断片長の 0.5 kbp と比べて長いため、領域 y で検出した TRF1 および TRF2 との共沈 DNA はテロメア繰り返し配列を含まないと推測される。このため、TRF1 および TRF2 はテロメア繰り返し配列から 0.2~1.1 kb 離れた領域のどこかに局在することが示唆された。一方で、TPP1 はこの領域に局在しないことが示唆された。

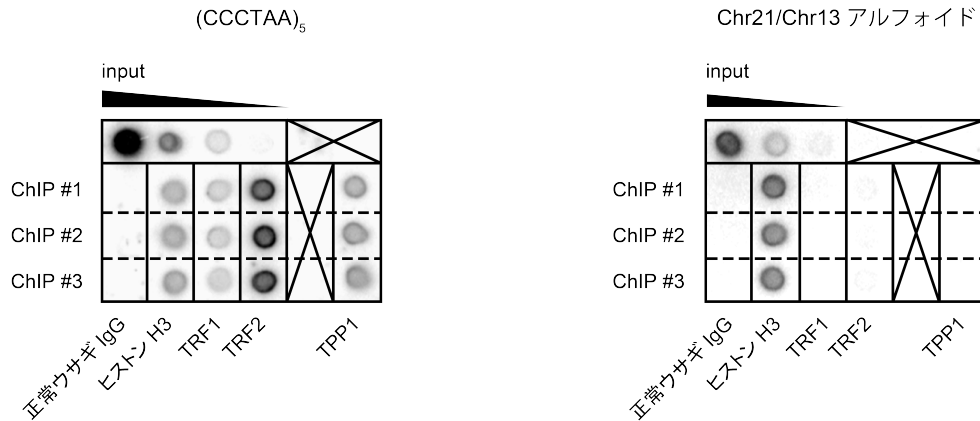
TPP1 は TIN2 を介して TRF1 や TRF2 と結合し、同じシェルタリン複合体構成因子としてテロメアに局在すると考えられる。このため、三者の間で結合分布に差があったことの説明として、次の二つの可能性が考えられる。一つは、異なる抗体間での免疫沈降効率の差異による見かけ上の効果の可能性である。しかし、抗 TPP1 抗体は領域 x を含む DNA を抗 TRF1 抗体より多く共沈しているにも拘らず、領域 y を含む DNA を後者に比べて共沈できていないため、免疫沈降効率に系統的な差があるにせよ領域 y で抗 TPP1 抗体のそれが特に低い理由があるとは考えにくい。二つ目は、実際に二者のクロマチン結合に差があり、TRF1 と TRF2 が TPP1 に比べてよりテロメアから離れた領域まで局在していることである。この仮説を支持する報告として、異なるがん細胞において、TRF1 と TRF2

の細胞内の蛋白質量が TPP1 に比べ約 10 倍富むことが挙げられる[64]。この、蛋白質の量比に応じた局在の広がりを示す可能性を検討するには、同じシェルトリン複合体を構成する他のテロメア蛋白質の局在がどちらの分布パターンを示すのかを調べるか、TRF1 もしくは TRF2 の蛋白質量を調節した際の結合分布を調べる必要がある。ただし、テロメア蛋白質は複合体を形成すること、および、テロメア全長にわたり均一な量比をもつ 6 因子複合体として存在しているかが不明なため、結果の解釈は難しいと思われる。

クロマチン免疫沈降実験において、コアヒストンであるヒストン H3 の存在は検出領域におけるヌクレオソーム構造を示す証拠であり、その結合量はヌクレオソームの密度と相関すると考えられる。ただし、クロマチンの高次構造により、抗ヒストン抗体の抗体反応において立体障害が生じる可能性があるため、特殊な高次構造をとることが疑われる領域における解釈には注意を要する。たとえば、テロメアにおいて、テロメア最末端がループ構造を形成してサブテロメア領域と近接した構造をとるとされる[65-67]。

上述のとおり、当実験に用いたクロマチン断片は鎖長 0.5 kbp 程度までのランダムな DNA 断片を含むため、領域 x で検出したヒストン H3 のシグナルがテロメア繰り返し配列上の結合に由来するのか、あるいは隣接する非テロメア繰り返し配列 (~0.5 kb) 上に形成されたヌクレオソームの局在を検出しているかは結論できない。しかし、上記の結果は、少なくとも人工テロメア繰り返し配列の近傍においてヌクレオソームが形成することを示している。また、領域 y において検出したヒストン H3 との共沈 DNA が領域 x、z に比べ少なかったことは、ヌクレオソーム密度の低下を生むような構造または活性がこの領域に存在する可能性が考えられる。これを検討するためには、マイクロコッカルヌクレアーゼによる消化から保護された DNA 断片の量を検出して、実際にヌクレオソームの形成量が少ないのか、ヌクレオソームの配置上少なく検出されるのかどうかを調べる必要がある。

A



B

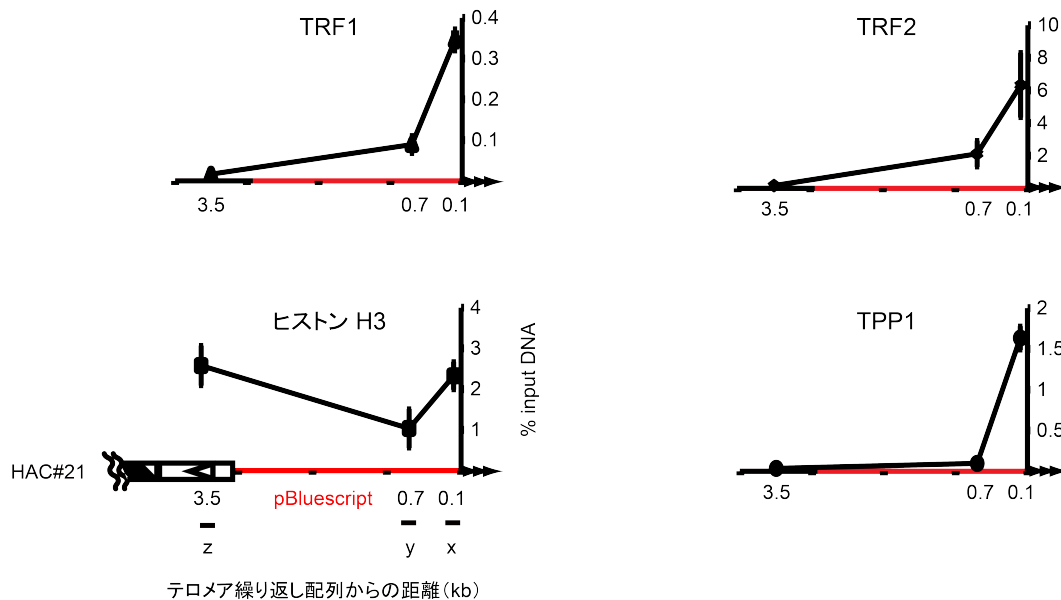


図 3-4 テロメア結合蛋白質は HAC#21 のテロメア繰り返し配列に接する領域に局在する
(A) クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験に用いた抗体の特異性。共沈降した DNA のスロットブロット検出結果を示す。テロメア繰り返し配列 DNA プローブ (左)、または 21/13 番染色体特異的なアルフォイド DNA プローブ (右) を用いた。異なる ChIP 実験ロット (#) の結果を示す。
(B) HAC#21 のテロメア近傍領域におけるテロメア蛋白質の局在分布。テロメア繰り返し配列より 0.1 kb (x)、0.7 kb (y)、3.5 kb (z) の領域をそれぞれ含む (グラフの横軸、数字はテロメア繰り返し配列からの距離を kb で示す。模式図参照)、シェルタリン (うち、TRF1、TRF2、TPP1) 共沈降 DNA を定量 PCR により検出した。ヒストン H3 と共沈降した DNA はテロメア繰り返し配列近傍領域にわたり存在したが、領域 y をもつものの量が相対的に少なかった。pBluescript 由来の配列部分を赤で示す。

3-4 HAC#21 のテロメア DNA は転写を受け、特徴的な転写産物を生じる

テロメア DNA は RNA ポリメラーゼ II により転写され、非コード RNA である TERRA (telomere-repeat-containing RNA) を産生する[31,32]。この現象は酵母からヒトまで観察され、テロメアにおいて転写反応を起こす共通の要因があることを示唆する。3-4 節では、複数の証拠により TERRA と共通の性質を示す転写産物が人工テロメアより生成することを証明したので、それについて述べる。

3-4-1 人工テロメア DNA は人工テロメア形成ベクター由来の特定の領域より転写される

TERRA はテロメアおよび核質に局在を示すことから[31]、HAC#21 において同種の転写産物が生じるならば、それは核内に濃縮される公算が高い。そこで、0.5% NP-40 を含む低張緩衝液にて細胞を処理し、核を多く含む沈殿画分より核内の RNA を濃縮精製して RT-PCR を行った (図 3-5A)。TERRA はテロメアに特徴的な 5'-UUAGGG-3' 繰り返し配列をもつため、そのような RNA を濃縮する目的で、5'-CCCTAA-3' 反復配列を 3' 末端にもつオリゴ DNA (CCCTAA プライマー ; 5' 側に 20 nt のタグ配列が付加されている) を用いて cDNA を作製した。これを鋳型に染色体特異的なテロメア直近の既知配列を PCR 増幅し、テロメア-サブテロメアの介在配列をもつ RNA を検出した[31]。

Xp-Yp 染色体由来の TERRA (Xp-Yp TERRA) を陽性対照としたとき、逆転写酵素に依存した PCR 増幅産物を HAC#21 の有無によらず検出した (Xp-Yp)。この Xp-Yp TERRA を検出した PCR 条件において、HAC#21 のテロメア近傍に存在する pBluescript 由来の配列は、逆転写酵素を加えたとき、HAC#21 保持細胞特異的に増幅された (HAC、HAC#21+かつ RT+)。同じ PCR 条件で両者の増幅産物を検出したことから、HAC#21 の人工テロメアも内在性 Xp-Yp 染色体と同程度量に転写を受けることが分かった。なお、Xp-Yp TERRA のシグナルがやや強く検出されたことは、その鋳型領域をもつ X 染色体が細胞当たり 2 から 3 本存在することによる可能性がある[68]。

次いで、上で同定した HAC#21 保持細胞に特異的な転写産物の転写開始点を決定するため、図 3-5A と同じ操作で精製した RNA を鋳型に 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) を行った (図 3-5B)。図の矢印の向きに pBluescript 配列に特異的な逆転写プライマーを設計し、単一のバンドシグナルを HAC#21 保

持細胞でのみ検出した（矢頭）。さらに、同じ泳動度を示すバンドシグナルを HAC#21-NIH-3T3 細胞においても検出した。これより、図 3-4A で HAC 保持細胞特異的に同定した転写産物は特異的な開始領域より転写されることが示唆される。そこで、矢頭で示すバンドをアガロースゲルから単離・精製し、塩基配列を決定した。その結果、転写産物の 5'末端はテロメアから約 2.3 kb 離れた pBluescript 配列内部の塩基に対応すること（青丸で図示）、および、それらの 22 bp および 27 bp 上流には TATA ボックスに似た塩基配列 5'-TATAAA-3'が存在することが分かった。本研究では、転写を生んだプロモーター活性の実体については詳しく解析していない。

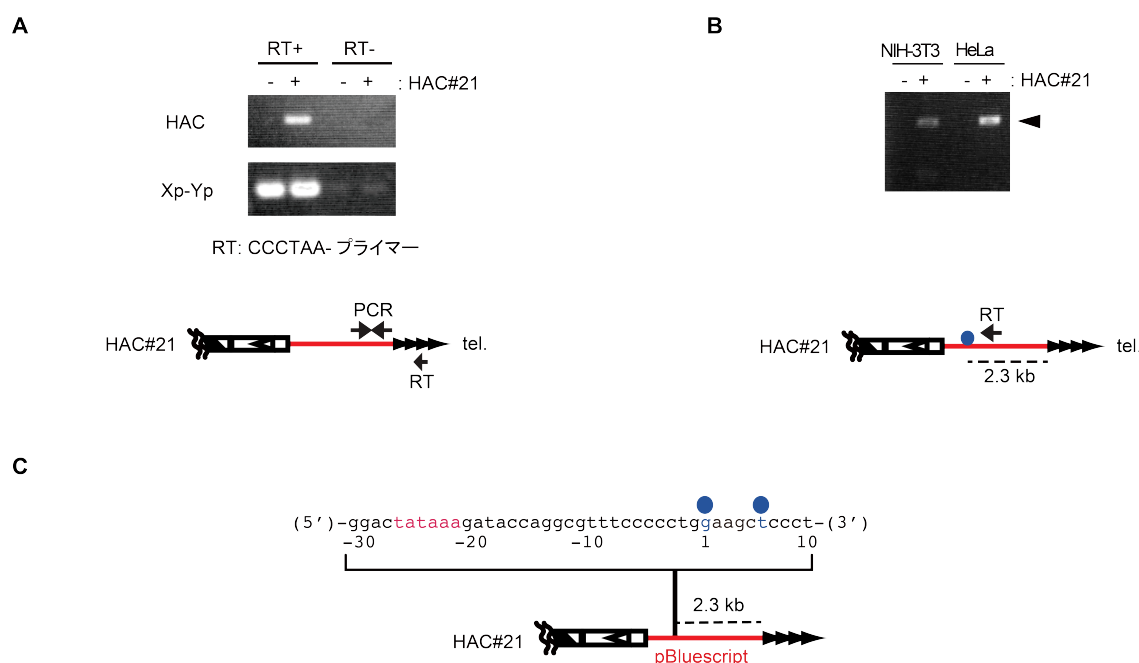


図 3-5 HAC#21 のテロメア繰り返し配列は近傍領域より転写を受ける

(A) HAC#21 テロメアから生じる転写産物の RT-PCR 解析。核に濃縮される RNA を鋳型にテロメア配列プライマー（CCCTAA- プライマー、図 RT の矢印の向きに伸長反応）を用いて cDNA を作製し、対照の Xp-Yp 染色体（Xp-Yp）、および HAC#21（HAC）のテロメア繰り返し配列近傍領域の既知配列を PCR により増幅した。

(B) HAC#21 のテロメア近傍領域の存在する転写開始点（TSS）の決定。pBluescript 由来の配列をもつ特異的プライマー（図 RT の矢印の向き）を利用して 5' RACE を行い、HAC#21 保持細胞特異的に、テロメア繰り返し配列から約 2.3 kb に位置する転写開始点を同定した（図の青丸）。

(C) B で決定した TSS の位置（青丸）。すぐ上流には TATA ボックス様の配列（赤字）が存在した。pBluescript 由来の DNA 領域を図に赤で示す。

HAC#21 のテロメア領域が RNA ポリメラーゼ II により転写されるのか否かを検討するため、抗 RNA ポリメラーゼ II 抗体を用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。RNA ポリメラーゼの C 末端領域 (CTD) の一次配列は YSPTSPS のコンセンサス配列 (各残基は序数をつけて呼ぶ) から成る反復構造をとり、転写反応の各段階において特徴的なリン酸化修飾を受けることが知られている[69]。すなわち、CTD の 5 番目のセリン残基がリン酸化 (S5P) された RNA ポリメラーゼはプロモーター直下に蓄積するが、この修飾を失い 2 番目のセリン残基がリン酸化を受けると (S2P) プロセッシブな転写反応を触媒する。従って、プロモーター付近では S5P の、転写中の領域においては S2P の修飾をもつ RNA ポリメラーゼ II が検出されると報告されている[59]。

RNA ポリメラーゼ II の各リン酸化型 CTD (S2P、S5P) に対する特異的抗体[59]、および、修飾の有無によらず CTD を認識する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、共沈した DNA を定量 PCR により定量した(図 3-6)。陽性対照として、ハウスキーピング遺伝子として知られるガンマアクチン遺伝子 (*ACTG1*) の転写開始点より 0.1 kb 下流の領域を解析した。*ACTG1* の転写開始点直下において、いずれの抗体を用いたときにも有意なシグナルを検出した。S5P 修飾型だけでなく S2P 修飾型の RNA ポリメラーゼ II を検出したことは、この遺伝子の転写伸長が活発であることを示唆する。抗 S2P 抗体を用いた免疫沈降の効率が他と比べ低いのは、この抗体の種類によるものであり、脱リン酸化速度が CTD のセリン残基により異なるためではないと思われる。

次に、HAC#21 に特異的な pBluescript 配列を利用して、人工テロメアより 0.1 kb、0.7 kb、2.5 kb 近位にある領域 (それぞれ、図 3-6 の x、y、w。領域 w はテロメア繰り返し配列より 2,405~2,482 塩基離れた領域) を解析した。HAC#21 上に同定した上述の転写開始点 (青丸) はテロメア繰り返し配列より約 2.3 kb 内側に位置するが、この直下に鋳型 DNA 特異的に増幅する定量 PCR プライマーを設計できなかったため、それより 0.2 kb 上流の領域 w をその代わりとした。まず、領域 w において S5P 修飾型の RNA ポリメラーゼ II を検出したことから、この領域付近に転写開始点があることを示唆し、このことは先の 5'-RACE 実験で得た結果を支持する。この領域 w で検出した結合シグナルの強度は *ACTG1* の転写開始点と比べて値が低いため、これはプロモーターに呼び込まれる RNA ポリメラーゼ II の量が当該領域で比較的少ない (転写頻度が低い) ことを意味するのかもしれない。しかし、転写開始点の両側で RNA ポリメラーゼ II の局在が不均等に分布している可能性もあるため、この実験結果からのみでは是非を判

断できない。次に、領域 x および y においてこの修飾型ポリメラーゼ (S5P) をほとんど検出しなかったことから、人工テロメア近傍に他の転写開始点が存在するという可能性は低いと推測された。さらに、新生 RNA 鎖を伸長している S2P 修飾型の RNA ポリメラーゼ II の存在が、領域 x および w において示唆された。領域 y は先に述べたテロメア蛋白質の結合を調べたものと同一であるが、ここでも RNA ポリメラーゼ II の局在が他の領域と比べて低く検出されたことは、何かこの領域において、高次構造の存在やソニケーションに感受性であるなど、クロマチン免疫沈降により DNA を共沈するのが困難な要因があることを示唆するのかもしれない。以上の結果は、HAC#21 のテロメア繰り返し配列から離れた位置において転写を開始し、伸長する RNA ポリメラーゼ II が、テロメアまで到達する可能性を示唆する。

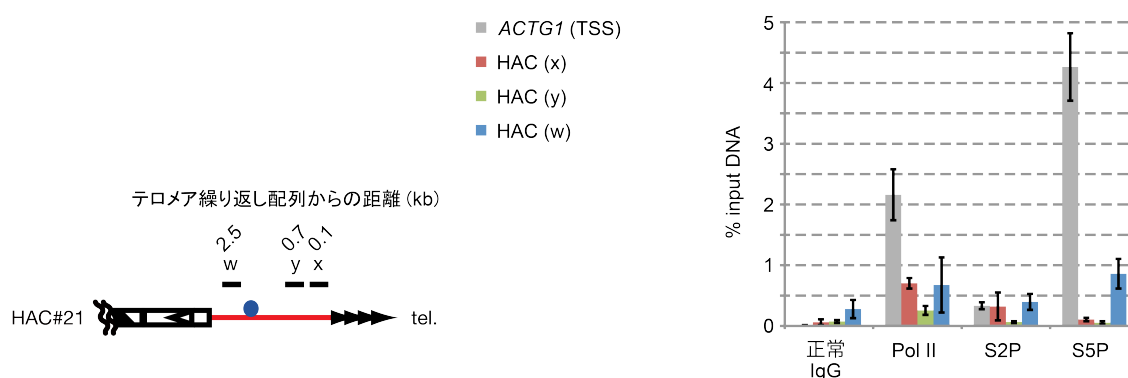


図 3-6 人工テロメア近傍領域における RNA ポリメラーゼ II の挙動

ChIP を行い、HAC#21 のテロメア繰り返し配列直近の領域 (x) において C 末端領域の 2 番目のセリン残基がリン酸化された RNA ポリメラーゼ II (S2P) を有意に検出した。領域 w の約 0.2 kb 下流領域に転写開始点 (青丸) が存在することに一致して、C 末端領域の 5 番目のセリン残基がリン酸化を受けたもの (S5P) を検出した。一方で、リン酸化の有無を区別しない抗体を用いたときには (Pol II)、RNA ポリメラーゼ II は人工テロメア近傍領域にわたり存在した (x、y、w)。ACTG1、g-actin 遺伝子転写開始点 (TSS) より約 0.1 kb 下流の領域。

3-4-2 HAC#21 のテロメアは数 kb にわたり転写される

HAC#21 から生成するテロメア転写産物の存在をさらに確かめるため、以下のノザンブロットを行った。細胞から抽出した全 RNA を、ビオチン標識した CCCTAA プライマーと試験管内で相補対を形成させたのち、アビジン固層化ビーズを加えて吸着したものから RNA を精製し、ゲルで分離した (図 3-7)。HAC#21 特異的な pBluescript 配列をプローブに利用して検出すると、0.9 kb から 6.7 kb の範囲に HAC#21 細胞に特異的なスメアシグナルが現れた。前節で同定した転写開始点をもつ転写産物をここで検出していると仮定すると、転写開始点からテロメア繰り返し配列までの距離 2.3 kb をスメアから予想される長さから差し引くことで、HAC#21 のテロメア DNA は数 kb にわたって、すなわちその大部分が、転写を受けることが推測される。スメアシグナルの下端の泳動度が 0.9 kb であることは 0.9 kb のサブテロメア転写産物にテロメア繰り返し配列が付加される可能性を示し、前節で決定したものとは別の弱い転写開始点がテロメア繰り返し配列から約 0.9 kb 離れた位置に存在する可能性を示唆するが、これを支持する結果は得られていない。別の可能性として、転写産物がヌクレアーゼによる RNA プロセッシングを受けた結果として短い転写産物が生じたことが挙げられる。結論として、テロメア G 鎖配列を繰り返しもつ RNA が HAC#21 において生成されることが言える。

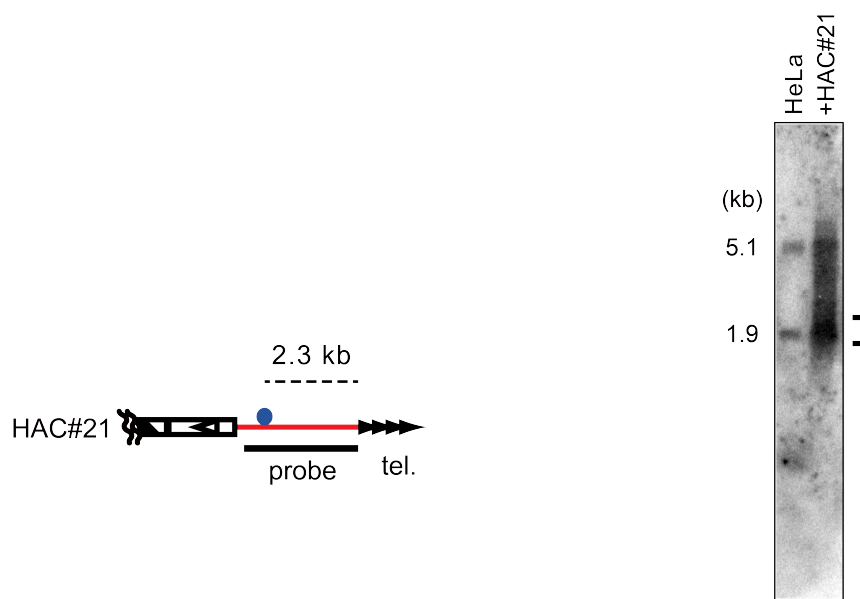


図 3-7 HAC#21 のテロメア繰り返し DNA は数 kb にわたり転写を受ける
ノザンハイブリダイゼーションによる HAC#21 テロメア転写産物の検出。精製した全 RNA を 5' -CCCTAA-3' 繰り返し配列をもつビオチン標識オリゴ DNA と混和したのち、テロメア G 鎖繰り返し配列をもつ RNA をアビジンビーズを用いて回収し、ゲルで分画した。ノザンハイブリダイゼーションのプローブは pBluescript 由来の配列（赤）を検出する。HAC#21 のテロメア配列から約 2.3 kb 離れた位置に転写開始点（青丸）が存在する。

3-4-3 HAC#21 のテロメア転写産物は RNA ポリメラーゼ II により生成する

以後、前々節で同定された HAC#21 のテロメア転写産物を HAC-telRNA と呼ぶ。前節の結果は、HAC-telRNA が異なる転写開始点から生じる不均一な集合体ではなく、むしろ、単一の転写開始点をもつ単一の転写産物であることを示唆している。

もし HAC-telRNA が RNA ポリメラーゼ II による転写産物であるならば、mRNA に一般に見られる修飾や挙動を示す可能性が考えられる。これを検討するため、本節ではまず、HAC-telRNA が RNA ポリメラーゼ II により生成することを検証した。テングタケ科の毒キノコ *Amanita phalloides* から単離された環状ペプチドである α -amanitin は、RNA ポリメラーゼ II と強い水素結合を形成してその鋳型上での転移反応を阻害する[70,71]。従って、この薬剤は転写開始および伸長反応のいずれも阻害する。そこで、増殖中の細胞に 20 μ M の α -amanitin

を添加して保温培養し、決まった時刻ごとに細胞を回収し、全 RNA に含まれる種々の転写産物の量を定量 PCR により測定した (図 3-8)。陰性対照として α -amanitin に非感受性の RNA ポリメラーゼ I により生成する 18S リボソーム RNA を用いたところ[72]、予想通りその RNA 量は減少しなかった。これとは対照的に、通常の mRNA として生成する GAPDH RNA は薬剤処理時間が延びるにつれ徐々に量が減少したことから、この実験において、 α -amanitin は RNA ポリメラーゼ II を特異的に阻害したと判断した。この条件において、HAC-telRNA の量は顕著な速さで単調減少した。この結果は、HAC-telRNA が RNA ポリメラーゼ II により生じることの強い証拠である。18S RNA に対する相対 RNA 量を薬剤処理後の各時刻で求めると、HAC-telRNA は 4 時間程度で半減することが分かり、一方で対照の GAPDH RNA は約 12 時間かかることが分かった。このことは TERRA が短寿命な RNA であるとの知見と一致する[31,60]。ところが、Xp-Yp TERRA は薬剤添加後の初めの 2 時間で急激に減少したものの、その後存在量が回復し、8 時間後から再び減少に転じた。 α -amanitin を短時間だけ処理した際の TERRA の量の変化を調べた報告はない。この観察結果を説明する最も単純な仮説は、 α -amanitin 処理細胞においては TERRA が一過的に RNA ポリメラーゼ II 以外の RNA ポリメラーゼによって生成されうるというものであるが、あるいは、RNA の核-細胞質間輸送の効率や平衡が mRNA 生成の阻害を介して変化したことによる現象 (例えば、核と細胞質で RNA の分解速度が異なる場合) なのかもしれない。

以上より、HAC-telRNA は RNA ポリメラーゼ II に依存して生成し、その転写阻害時に速やかに分解されることが分かった。後者の知見は、HAC-telRNA の RNA 量が強く制御されていることを伺わせる。

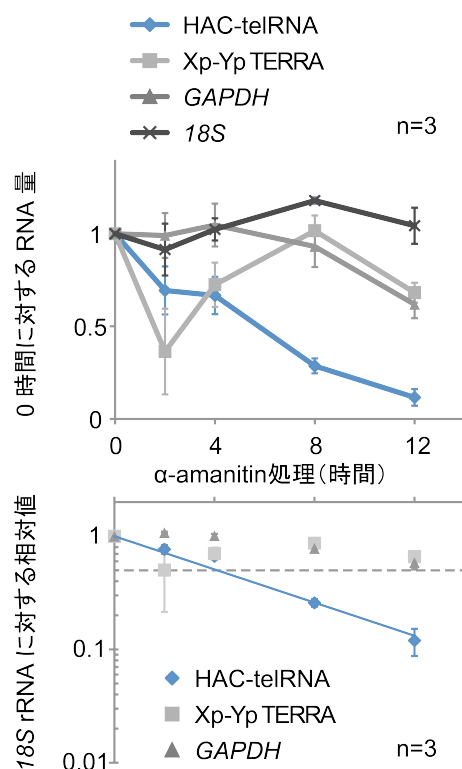


図3-8 HAC#21 由来のテロメア転写産物はRNAポリメラーゼ II に依存して生成する

増殖中の HAC 保持 HeLa 細胞を 20 µg/ml のα-amanitin で横軸に示した時間だけ処理後、全 RNA を回収し、定量 RT-PCR により転写産物量の変化を調べた(上)。個々の RNA 量を 18S rRNA に対する相対値で示した(下)。HAC-telRNA はα-amanitin 添加後に約 4 時間で半減した(実線)が、GAPDH RNA は約 12 時間かかることが分かった。

3-4-4 HAC#21 のテロメア転写産物はスプライシングを受ける

3-4-1 節、HAC#21 特異的 RNA の 5'-RACE 実験から取得した cDNA 配列を、テロメア形成ベクターの塩基配列から予想される HAC#21 染色体配列(図 3-9A、中段)と比較したところ、cDNA から欠失している領域が HAC#21 に存在した(上段の灰色の四角は両者で一致する部分を示す)。欠失部分の塩基配列を詳しく調べると、その両端の配列がスプライシンドナーおよびアクセプター配列の 5'-GT...AG-3'であったため(赤字)、HAC-telRNA がスプライシングを受けたことを疑った。そこで、テロメア繰り返し配列のすぐ上流および HAC-telRNA の転写開始点直下にそれぞれ PCR プライマーを設計して HAC-telRNA の RT-PCR を行ったところ、HAC#21 保持 HeLa 細胞より抽出したゲノム DNA を鋳型に用いた時と比べ、増幅産物の移動度がより大きいことが分かった。次に、スプライシングが疑われる領域を両側からはさむように PCR プライマーを設計して PCR を行ったところ、スプライシングから予想される長さの泳動度を示すバンドが得られた。この塩基配列を決定すると、HAC-telRNA は 5'-GT...AG-3'の領域を欠いた二種類のスプライス型(それぞれ、551 nt および 525 nt のイントロン

を除去されたスプライス型 1 およびスプライス型 2) からなることが分かった。

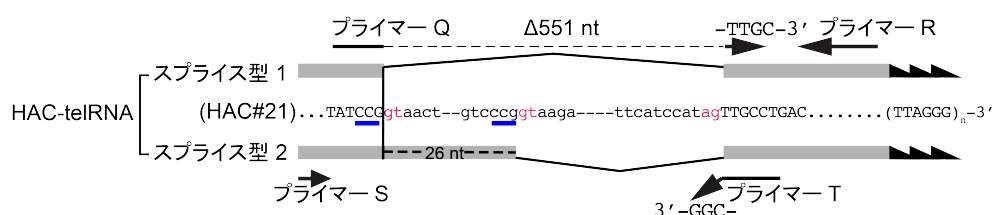
HAC-telRNA がスプライシングを受けることを別の方法で裏付けるため、HAC#21 の予想配列をもとに、存在が疑われるスプライシング変異体の特異的に増幅するような PCR プライマーを二種類設計した (図 3-9B、9C)。

まず、551 nt のイントロンを欠いたスプライス型 1 のみを検出するようにプライマーQを設計した(図 3-9B)。プライマーQはイントロン切除後の HAC-telRNA 配列のみと完全に塩基対を形成できるため、プライマーRとともに PCR を行うと 123 bp の増幅産物を生じる。この PCR により、HAC#21 保持細胞特異的に、泳動度の一致する増幅産物を予想通り得られた。以上の結果は HAC#21 保持 HeLa 細胞における結果であるが、この結果は NIH-3T3 細胞が HAC#21 の宿主である場合にも、独立した微小核細胞融合クローンについて同様に得られた。このように、生物種の異なる細胞が維持する HAC#21 に共通して検出されたことから、スプライシングが、HAC#21 のもつ内部配列により予め規定されていた、またはテロメア繰り返し DNA 配列近傍に転写配列が存在することで促進された、との二通りの解釈が考えられる。




次に、予想される両方のスプライス型を同時に検出するため、図 3-8(下)の位置にプライマーTを選んだ(図 3-9C)。両者とも、第 1 エキソンが CCG-3'末端をもち、共通の第 2 エキソンで始まる (5'スプライス部位の位置のみ異なる)。このため、プライマーTを第 1 エキシソンの共通部分に位置するプライマーSとともに PCR を行うと、予期したとおり、DNA 鎖長が異なる二つのバンドシグナルを HAC#21 特異的に増幅した。この結果は、二種類のスプライシング変異体の 5' スプライス部位の位置が一次転写産物上で 26 塩基隔てて位置する予想に合致する。

以上から、cDNA の塩基配列決定と RT-PCR により HAC-telRNA のスプライシングを行い、二種類のスプライシング産物を生成することを確認した。スプライシングを受けた産物のうち、二つのスプライス型はほぼ等量比で存在することが分かったが(図 3-9C)、スプライシング効率は、PCR プライマー設計上の問題(鋳型 DNA のみに依存して増幅する pBluescript 配列プライマーを、イントロン配列の両側にも内側にも設計できなかった)のため決定できなかった。イントロンをもつ HAC-telRNA も存在した。

A



B

	NIH-3T3		HeLa	NIH-3T3		HeLa				
	P	#5	#22	P	#1	P	#5	#22	P	#1
puro:		+	+	+		+	+	+		+
HAC-telRNA スプライス型 1										
puro'										
18S										
	RT+					RT-				

C

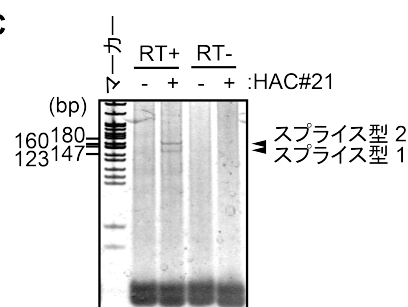


図 3-9 HAC のテロメア繰り返し配列転写産物はスプライシングを受ける

(A) 予想される 2 組のスプライシング部位を特異的に検出する RT-PCR。HAC#21 染色体配列において、cDNA 配列から疑われるエクソン（大文字）およびイントロン（小文字、551 または 525 塩基）領域の一つを中段に示す。赤字は、スプライシングのドナーおよびアクセプター配列。スプライシングを受けた HAC-telRNA のみ検出するため、片方のプライマー（Q, T）にはスプライシングにより生じるエクソン同士の介在配列を用いた。プライマー Q と R とはスプライス型 1 を特異的に検出する。一方、両方のスプライス型 HAC-telRNA は第 2 エクソンを共有し、かつ第 1 エクソン末端 3 塩基の配列が等しいと予想されるため（A の青下線部分）、CGG-3' 末端配列をもつプライマー T とプライマー S を用いることで両者の存在比を検討できる。

(B) プライマー Q と R を用いた RT-PCR。HeLa 細胞および NIH-3T3 細胞の複数のクローン（#1、#5 と #22）において、スプライス型 1 の構造をもつ HAC-telRNA を検出した。puro'、HAC#21 の薬剤選択遺伝子。puro は、puromycin 添加培地で培養したことを示す。

(C) プライマー S と T を用いた RT-PCR。第 1 エクソン長の異なるスプライス型 HAC-telRNA に相当する 2 本のバンドが、同程度のシグナル強度で検出された（矢頭）。

3-4-5 多くの HAC#21 テロメア転写産物にはポリ A 配列が付加されない

HAC-telRNA が RNA ポリメラーゼ II により生成することが示されたので、本節および次節では、それが一般的な mRNA に見られる修飾を受けまた同様の挙動を示すか否かを検討した。

一般的な mRNA はその 3' 末端にポリ A 配列を付加され、これが転写産物の安定性および核外輸送に機能していることが知られる。そこで、HAC-telRNA にポ

リ A 配列が付加されているか否かを確かめるため、オリゴ dT カラムに細胞内全 RNA を通してポリ A 画分の RNA を取得し、そこに含まれる HAC-telRNA を定量 PCR にて測定した (図 3-10)。予備実験により、RT-PCR の増幅効率が鋳型 RNA の純度によって変わることが示唆された。そこで、mRNA が細胞内全 RNA の高々数%を占めるにすぎないことを考慮し、細胞内全 RNA にポリ A 画分の RNA を決まった割合で加え、これを加えない場合と並行して定量比較した。GAPDH RNA およびスプライシングを受ける非コード RNA である NEAT1 RNA は、加えたポリ A 画分 RNA の量に相関してその検出量が増加した。これは、これらの転写産物がポリ A 付加され成熟することを示している。一方で、snRNA でありポリ A 配列が付加されない U1 snRNA、およびポリ A 配列をほとんど付加されないことが予想される Xp-Yp TERRA はポリ A 画分を加えても検出量にほとんど変化がなかった。このことは、U1 snRNA がポリ A 配列付加を受けず別の経路によりその 3'末端が形成すること[73]、高々7%の TERRA 分子にポリ A 配列が付加されていること[60,74]に一致する。次に、HAC-telRNA をこの方法で検定して後者と同じ結果を得た。このため、HAC-telRNA のポリ A 配列付加は起きていないか、ごく低効率で起きることが示唆された。

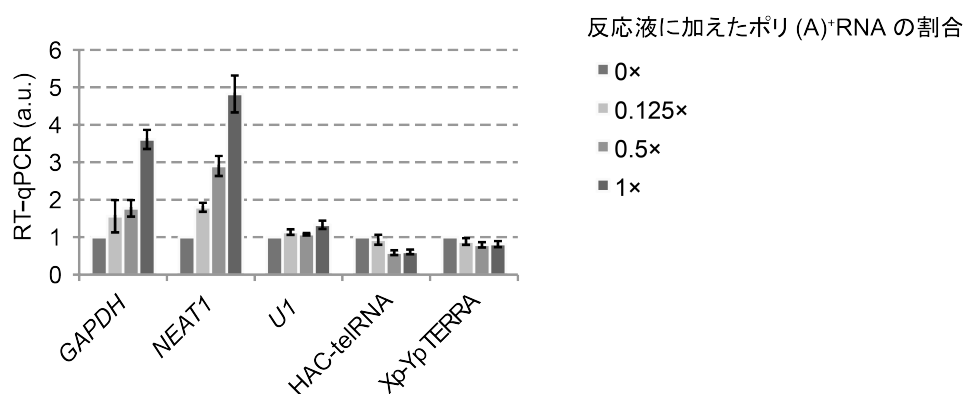


図 3-10 HAC#21 由来のテロメア転写産物の多くはポリ (A) 配列をもたない

精製した全 RNA を二分し、片方をオリゴ dT カラムに通して結合画分の RNA を回収した。両者を様々な比率で加え (ポリ (A) RNA/ 全 RNA = 0、0.125、0.5、1。1× は、加えたポリ (A) RNA がカラムを通す前の全 RNA と等量)、定量 RT-PCR の鋳型 RNA とした。転写産物がポリ (A) 配列をもつならば、ポリ (A) 画分の RNA を加える量に依存して増幅産物の量が増加する。GAPDH mRNA および NEAT1 非コード RNA はポリ (A) 配列付加を受け、U1 スプライソソーム RNA はポリ (A) 付加されず、TERRA は少数の分子のみポリ (A) 配列をもつことが知られる。検出感度の問題で、転写産物のごく一部がポリ (A) 配列をもつ場合には、この実験で必ずしも検出できない。

3-4-6 HAC#21 のテロメア転写産物はクロマチンに結合する

前節の結果より、HAC-telRNA が細胞内で偏った局在を示す可能性が考えられた。そこで、細胞を分画して細胞質、核質、クロマチンの画分に含まれる全 RNA をそれぞれ精製し、HAC-telRNA の存在割合の相対値を、遺伝子特異的な逆転写プライマーを用いた定量 RT-PCR により測定した (図 3-11)。

まず、細胞内分画が期待通りに行われたかどうかを知るため、指標となる蛋白質の局在をイムノブロットにより調べた (図 3-11A)。解糖系酵素の GAPDH、RNA 結合蛋白質の hnRNPA1、ヒストン H2B はそれぞれ、期待されるとおり、細胞質と核質、核質とクロマチン、クロマチンの画分に含まれた。微小管構成因子のチューブリンは細胞質ではなく核質に多く検出されたが、これは、重合したチューブリンが、用いた透過処理条件下で細胞膜から外に移行しなかったためと考えられる。また、リボソーム形成に関わり核および核小体に存在するヌクレオリンは核質およびクロマチン画分に検出されたため、核内構造が操作の過程で保たれていたものと考えられる。

次に、それぞれにおける RNA の存在割合を調べた (図 3-11B)。各画分に含まれる目的 RNA の総和を 1 として、GAPDH RNA は約 8 割が核質画分に、残りが細胞質画分に検出された。核内構造体であるパラスペックルの構成因子である NEAT1 RNA は、主に核質画分に含まれた。一方、UI および不活化 X 染色体に結合する XIST RNA (HeLa 細胞は女性由来で XIST を発現している) はクロマチン画分に多く含まれ、それぞれ染色体上で機能することと一致する。Xp-Yp TERRA も同様に、クロマチン画分に顕著に含まれ、TERRA がテロメア局在を示す知見と合致している[31,45]。そこで、スプライシングの有無に関わらず全ての HAC-telRNA 分子を検出するプライマーを用いたところ、それは Xp-Yp TERRA と同程度にクロマチン画分に濃縮された。この結果は、HAC-telRNA も Xp-Yp TERRA と同じくテロメアに局在する可能性があることを示唆する。また、スプライス型 1 のみを検出したとき、クロマチン画分に含まれる割合がさらに増加したことから、HAC-telRNA のクロマチンへの局在にはスプライシング反応またはスプライシング因子が関与している可能性が示唆された。

これらの結果から HAC-telRNA は TERRA と同様にクロマチンに多く存在する転写産物であると分かり、何らかの局在化機構があり、それは TERRA と共通で

あることが期待される。

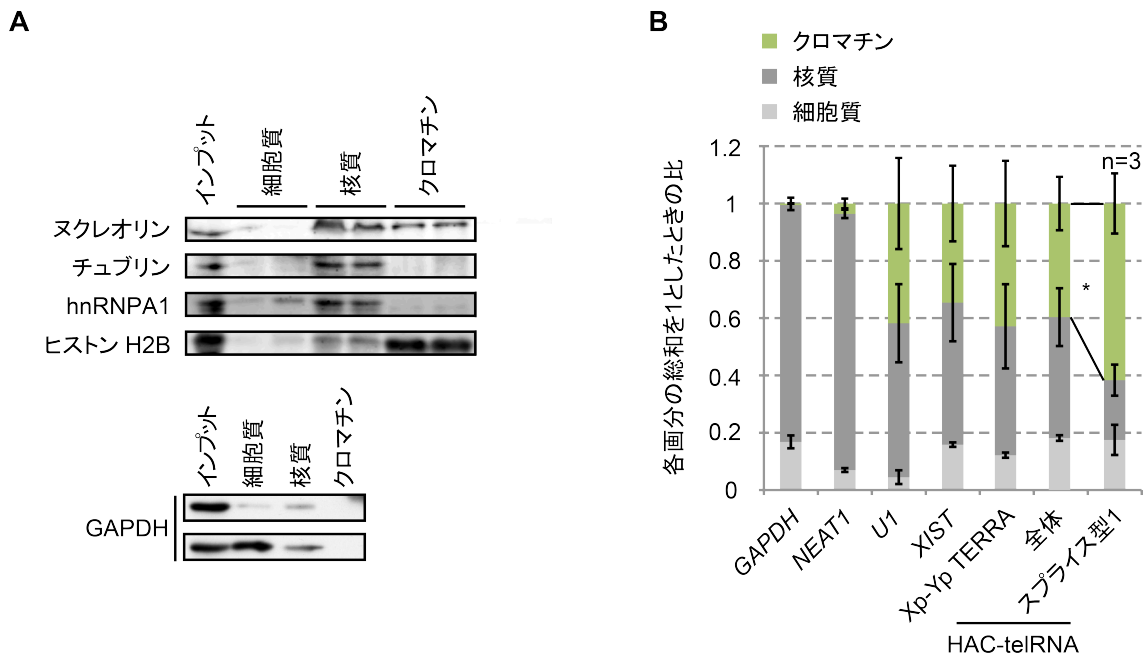


図 3-11 HAC#21 のテロメア転写産物はクロマチン上に局在する

(A) 蛋白質マーカーの分画効率。HAC 保持 HeLa 細胞を分画して得た細胞質 (Cyt)、核質 (NP)、クロマチン (Chr) の各画分に含まれる蛋白質を、イムノブロットで検出した。

(B) HAC-telRNA の細胞内局在。各画分に含まれる全 RNA を精製し、遺伝子特異的逆転写プライマーを用いた定量 RT-PCR により個々の転写産物の存在比を測定した。Xp-Yp TERRA (Xp-Yp) および HAC-telRNA (HAC) はクロマチン画分に顕著に含まれた。NEAT1 非コード RNA は核内構造体パラスペックルの核を構成し、U1 RNA はスプライソソームに含まれ、XIST RNA は不活化 X 染色体に結合する。HAC-telRNA のスプライス型 1 のみを検出すると、HAC-telRNA 全体と比べクロマチン画分に含まれる割合が増加していた (* $p=0.04$)。

3-4-7 テロメア蛋白質 TRF1 はテロメア領域における転写調節に関わる

テロメア結合蛋白質が TERRA の転写調節に関与する可能性についての結果が報告されている。出芽酵母のテロメア二本鎖結合蛋白質 Rap1p は、サブテロメアに存在するシス配列局在因子を介して、TERRA の生成を抑制することが知られるが[75]、その一つはテロメア領域の遺伝子サイレンシングを行う Sir 複合体である。Sir 複合体は修飾ヒストンとの結合を介してサイレンシングに機能し

[76]、高等真核生物においてもヒストン修飾を介した TERRA の転写制御が疑われている[43]。一方、哺乳類のテロメア二本鎖結合蛋白質の一つ TRF1 は、マウス細胞において、RNA ポリメラーゼ II のテロメア領域への呼び込みには必要なく[32]、TERRA の生成にも必須ではない[77]。しかし、上記の実験は全ての TERRA の平均的挙動を観察したものであり、プロモーターごとに TERRA の転写制御が異なる可能性もあるため、個々の TERRA の挙動はそれと同一でない可能性が残っている。そこで、以下ではヒト TRF1 に着目し、その mRNA ノックダウンによる影響を HAC#21 由来の HAC-telRNA について検討した（図 3-12）。

TRF1 に対する siRNA 処理を行って 2 日後に細胞から全 RNA を回収し、種々の RNA の量を RT-PCR により解析し、*18S* rRNA に対する相対量を求めた。siRNA の効果は *TRF1* に特異的であり、*TRF1* mRNA は対照細胞に比べて二割程度までに減少したのに対して、*GAPDH* RNA の量には変化がなかった（図 3-12A）。このとき、Xp-Yp 染色体および 15q 染色体に由来する TERRA は増加傾向にあり、同様の傾向がテロメアから数 kb の距離にある puromycin 耐性遺伝子 (HAC#21) および *WASH* 偽遺伝子（複数の染色体のサブテロメアに存在[78]）の転写産物についても観察された（図 3-12B）。これらは HAC#21 の人工テロメアもしくは内在性染色体のテロメア近傍に位置する遺伝子から転写されるという共通点があるものの、特定の蛋白質をコードする mRNA とテロメア繰り返し配列をもつ非コード RNA とでは転写産物の制御が大きく異なると思われる。しかし、それにも拘らず等しく増加傾向を示したことから、TRF1 を介した共通の転写制御下にあることが示唆される。一つの可能性として、ヒストン修飾を介した機構が考えられるが、この探索は今後の課題である。ただし、テロメア長、ヒストン修飾の量、TERRA の転写量はフィードバックを介した相互的な依存関係にあることが予期されるので[40,44,79-81]、それぞれの変数を独立して人為的に調節するために、TERRA の転写誘導系を作製して因果関係を解くことが必要と考えられる。

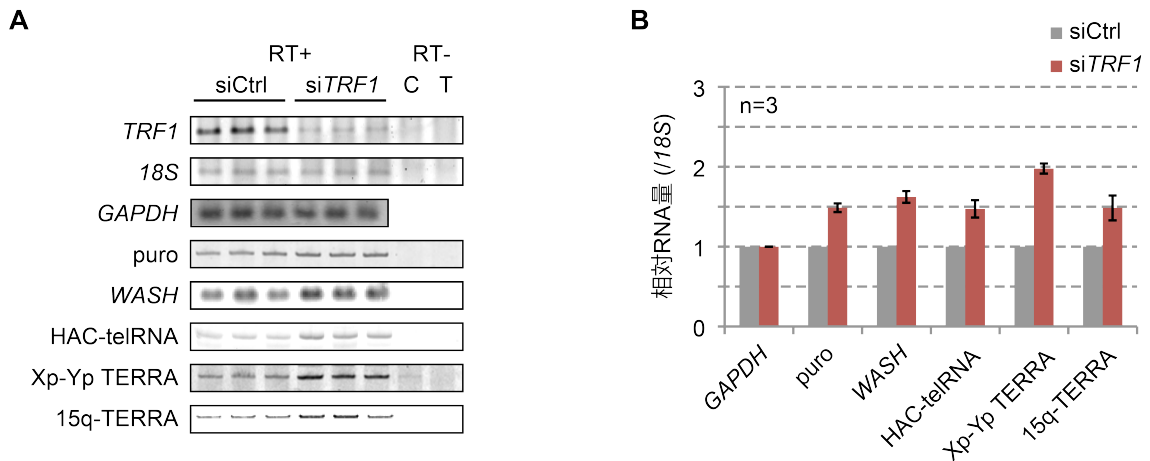


図 3-12 テロメア結合蛋白質 TRF1 のノックダウンによりテロメア近傍領域の転写が変化する

(A) *TRF1* 遺伝子のノックダウンにより増加する転写産物。siRNA 処理して 48 時間後に全 RNA を抽出し、それぞれの RNA 量を RT-PCR により調べた。puro : HAC#21 のテロメア繰り返し配列から 3.5 kb の位置に転写開始点をもつ薬剤耐性遺伝子。WASH : 複数のサブテロメアにコピーをもつ偽遺伝子で、テロメア繰り返し配列から数 kb 以内の距離に転写開始点をもつ。15q-TERRA : 15 番染色体長腕由来の TERRA。siCtrl, 陰性対照配列の siRNA 処理。

(B) A の核酸染色像の定量。18S rRNA に対する相対 RNA 量として示した。

第四章

考察

4-1 HAC#21 を用いた単一テロメア解析

本研究では、異なるサブテロメアをもつ多数のテロメアの平均をとることでマスクされてしまう挙動を探索するため、特定のサブテロメア配列をもつヒト人工染色体のテロメアを他から区別して解析した。

まず、HAC#21 の人工テロメアは哺乳類細胞において安定的に維持されることが示唆された。実際、耐性遺伝子をテロメア近傍にもつ puromycin による選択なしでも、ほとんどの HAC#21 は 6 週間の培養後に HeLa 細胞から脱落していなかった。このため、哺乳類細胞において HAC#21 のテロメア DNA はテロメラーゼによる伸長とヌクレアーゼによる消化の平衡として維持されることが示唆される。しかし、その結果として HAC#21 のテロメアは全染色体のテロメア平均と同程度の長さの分布を示したと考えられる。一方で、少なくとも NIH-3T3 細胞においては HAC#21 のテロメア長にクローン間の差があることを示唆する結果を得ており、そのような平衡点を決めるエピジェネティック因子の解析に HAC#21 を用いる利点があるのかもしれない。

以下の節で説明するように、本研究において人為的に挿入したテロメア繰り返し配列が染色体末端としての性質を示したことは、テロメア維持機能の新たな確立という点で興味深い。ただ、HAC#21 の作製は DT40 細胞内で行われ、それを微小核細胞融合により哺乳類細胞に導入したため、種間で保存性の高いエピジェネティックな情報はそのまま受け継がれた可能性がある。

4-2 人工テロメアの DNA 複製

人工テロメアの複製の時期について、人工テロメア形成ベクター挿入領域付近に元々存在する複製起点の自然な発火か、もしくはテロメア繰り返し配列の挿入により変化したもののいずれかを観察している。本研究では、HAC#21 のテロメア近傍領域が HeLa 細胞において S 期中期に複製されることを示した。HAC#21 を導入前の HeLa 細胞において、人工テロメア領域付近の BrdU 取り込み時期は S 期中期に起きた。21 番染色体上、挿入部位付近の複製時期が、HAC#21 においてそのまま維持されたと解釈することもできる。ヒトテロメアの複製時期が染色体特異的に決まっており[23-26]、テロメア繰り返し配列の存在が複製時期の前後関係そのものを決定する主要因であるとは考えにくい、狭い決ま

った範囲にある複製起点を毎回の細胞周期で活性化するなどして複製の同調性を保証している可能性はある。

4-3 HAC#21 の人工テロメアとテロメア結合タンパク質

テロメアのクロマチンは他のヌクレオソーム形成領域と異なることが示唆され[65,66]、テロメア蛋白質の局在が特異なクロマチン形成に寄与している可能性がある。これを検討するため、本研究ではクロマチン免疫沈降実験を行い、HeLa 細胞の HAC#21 において、テロメアから 623~700 塩基離れた領域を含む DNA 断片が TRF1 および TRF2 と共沈降することが分かった。検出した DNA 断片長は 0.5 kbp 以下であるので、テロメアから 0.2~1.1 kb 離れた領域での蛋白質結合を検出したと推測される。ヒト HCT116 細胞では、Xq-Yq 染色体のテロメアから 1 kb 離れた領域まで TRF1 および TRF2 の弱い局在が報告された[82]。以上から、ヒト細胞では、テロメア蛋白質が塩基配列によらず 1 kb 程度まで局在しうると考えられる。局在を促進する積極的な相互作用があるのか、また、テロメアに限らず高度な繰り返し DNA 領域に形成されるクロマチン高次構造の特徴であるのか不明である。

テロメアに特殊な局在化機構の可能性として、テロメア高次構造の時間的な変動によりテロメアとサブテロメアクロマチンが三次元的に近接することが挙げられる。TRF1 や分裂酵母ホモログの Taz1 はテロメア二本鎖 DNA の複製に必要であることが知られており[77,83]、細胞周期を通した TRF1 の結合解離がテロメアの機能維持に重要であることが示唆されている[84]。細胞周期、中でも S 期、においてテロメアの構造が大きく変化することが期待されるため[85]、HAC#21 を用いて上述のテロメア DNA 複製時期に TRF1 の結合分布の変化を検出できる可能性がある。序で述べたように、HAC を用いた系ではテロメア全体の解析より鋭敏な観察が可能と期待されるので、同調複製する HAC#21 のテロメアを経時サンプリングして比較することには利点があると思われる。また、直近のサブテロメア配列を人為改変しうることから、複製起点を誘導的に形成・活性化するようなシス配列を挿入し、逆に、複製フォークの進行がもたらすテロメアへの直接的影響とそのフィードバックの有無を、時系列で追跡することが考えられる。これは、内在性の染色体を用いて行うには困難な課題であり、ここに HAC を用いることの利点がある。

また、哺乳類テロメア領域にはヌクレオソームが形成されうることが示唆さ

れ、ゲノム平均と比べヌクレオソーム間隔が規則的で狭く (157 vs. 197 bp) [66]、単量体ヌクレオソームに相当するシグナルの安定性が低いことが知られる[65]。テロメア繰り返し配列一単位が 6 bp であることから、これらはテロメア DNA 上のヌクレオソーム形成起点がランダムであることを示唆する。もし、テロメアのヌクレオソームが規則的に長く、始点の位置が不定に形成されるなら、その優先的な配置形成を補償する領域がテロメア直近に存在し、そこではヌクレオソーム形成しにくい可能性がある。原核生物由来のためヌクレオソーム形成能が弱いことが予想される pBluescript 配列がテロメア繰り返し配列に接する難点はあるが、この可能性は、HAC#21 の特異的配列を利用して検証可能と考えられる。ヒストン H3 のクロマチン免疫沈降実験においてテロメア繰り返し配列から 0.7 kb の領域で共沈 DNA 量が減少していたが、それは実際にヌクレオソーム密度の減少を示唆するのかもしれない。

4-4 HAC#21 の人工テロメアと TERRA

内在性のテロメアより TERRA が生じることはよく知られているが[31]、人工テロメア形成により生じたテロメアが転写を受けるという報告はこれまでない。本研究により、HAC#21 のテロメア DNA は転写産物 HAC-telRNA を生じ、それが以下の点で TERRA との共通性をもつことが明らかとなった。HAC-telRNA は、TERRA と同じくテロメア繰り返し配列より高々数 kb 離れた領域にある単一の転写開始点をもち、RNA ポリメラーゼ II により生成された。また、ポリ A 配列がほとんど付加されず、クロマチンに顕著な割合で局在した。

4-4-1 TERRA の転写開始機構

HAC-telRNA への転写に特徴的なことは、HAC#21 が、ヒト 21 番染色体長腕部短縮によりテロメアを形成したために、仮に TERRA を生む特定のシス配列がサブテロメア領域内に存在したとしても、HAC#21 人工テロメア近傍がそれをもつ可能性が低いことである。これから示唆される二つの可能性は、テロメア繰り返し配列あるいは染色体末端が近傍領域への積極的な転写誘導活性をもち、HAC#21 の人工テロメアにおいても同様であること、あるいは、テロメア近傍領域から偶発的に起きたその場限りの転写事象の結果として、そのテロメア繰

返し配列転写産物を TERRA と同様に成熟させる機構が存在することである。言い換えると、前者においては TERRA として転写するための特別な転写制御機構が存在し、後者では転写された産物の配列がテロメア繰り返し配列であることが重要である。後者については後の節で述べる。

前者の可能性に沿って、HAC-telRNA の転写開始点から上流 500 bp の領域、および、約半数のサブテロメアに存在してヒト TERRA への転写に十分とされる 494 bp の CpG 配列に富む領域 (29-37 repeats)[42]を検索配列に用いて、プロモーター配列を予測するソフトウェア Proscan ver. 1.7

(<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) により、シス配列の候補を探索した。この結果、GC 含量の高いシス配列が濃縮され、転写因子 Sp1 の結合配列および結合因子未知のシス配列 JCV_repeated_sequence と EARLY-SEQ1 が両者で共通に予測された。サブテロメア領域は G:C 塩基対に富むことから[10]、Sp1 の認識配列 5'-GGGCGG-3'[86]は一般にテロメア近傍領域に存在する見込みが高い。また、TATA-box 類似配列は、HAC-telRNA の転写上流配列で予測され、29-37 repeats ではなされなかった。

哺乳類 Sp1 は、出芽酵母の中でヘテロクロマチンの遺伝子抑制効果を遮断するバウンダリー活性を示すことが知られ、その結合領域の片側から生じるヘテロクロマチンのスプレッディングから遺伝子発現抑制を防ぐとされる[87]。この報告では、テロメア近傍での遺伝子発現抑制はバウンダリー因子の結合のみでは解除されないが、哺乳類細胞では TERRA への転写を保証するための必要因子として Sp1 がテロメア近傍で機能する可能性があるという提唱されている。ヒト細胞でテロメア蛋白質のスプレッディングの程度が低く観察されたのは、テロメア近傍にバウンダリー活性が存在するための可能性がある。

4-4-2 TERRA の成熟

4-4 の冒頭で述べたように、テロメア DNA 配列内部で転写反応が起きることが TERRA への成熟を促している可能性がある。本研究では、HAC-telRNA がスプライシングを受けること、およびポリ A 配列をほとんど付加されないことを明らかにした。テロメア繰り返し配列はポリ A 付加シグナルである 5'-AAUAAA-3'配列[88]をもたないため、TERRA の 3'末端は mRNA とは異なるプロセッシングを経て成熟し、テロメアに局在することが予想される。実際、TERRA の 3'末端は AAG-3'配列をもつことから[60]、転写が特定の塩基で終結す

るか TERRA の 3'末端からの特異的な消化によってこのように末端配列が決定されることが考えられる。一方で、TERRA の 5'末端は一般の mRNA と同じキャップ構造が存在するため[60]、TERRA が特異的であるのはテロメア配列を付加されて以後のことだと推測される。TERRA のプロセッシングについて現時点ではほとんど知られていないが、ポリ A の欠如に関して HAC-telRNA は TERRA と一致しており、共通の成熟機構を経る可能性がある。

次に、HAC-telRNA はサブテロメア配列内部でスプライシングを受けた。TERRA がスプライシングを受けるとの報告はないが、質量分析機を用いた解析によりテロメアにスプライシング因子が局在することが分かっている[89,90]。また、分裂酵母のセントロメアにおいてスプライソソームの構成要素である U4 snRNA が、セントロメア非コード RNA の切断による siRNA 産生とその帰結であるヘテロクロマチン形成に必要であることが遺伝学的解析から示唆されており[91]、特定のスプライシング因子が非コード RNA 上に集積することがそのクロマチンへの局在とプロセッシングに寄与する可能性が疑われる[92,93]。このことから、TERRA もしくは HAC-telRNA のクロマチンへの局在化機構にスプライシング因子が関与する可能性が考えられる。これらの予想されるプロセッシング因子が何をシグナルにテロメアへ集積するのかは明らかでない。

4-5 今後の展望

本研究において、HAC#21 の人工テロメアは内在性のテロメアと同じ性質を示すことが分かった。とくに、TERRA と共通する性質をもつ HAC-telRNA への転写は HAC#21 のテロメア維持に関わる可能性があるため、これを明らかにすることが 1つの方向性と思われる。また、人工テロメア形成ベクターの配列を替えサブテロメア配列を任意に改変しうると考えられるので、転写反応（誘導、停止、終結、アンチセンス転写）、複製反応（開始誘導、伸長遅延、促進因子のテザリング）、ヌクレオソーム配置やクロマチン修飾などを操作するツールとしての HAC の利用が興味深い。

参考文献

1. de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19: 2100-2110.
2. Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41: 181-190.
3. Lingner J, Cooper JP, Cech TR (1995) Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 269: 1533-1534.
4. Wang F, Stewart JA, Kasbek C, Zhao Y, Wright WE, et al. (2012) Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. *Cell Rep* 2: 1096-1103.
5. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F (2001) In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol* 21: 5753-5766.
6. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
7. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
8. Palm W, de Lange T (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 42: 301-334.
9. Riethman H, Ambrosini A, Paul S (2005) Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Res* 13: 505-515.
10. Ambrosini A, Paul S, Hu S, Riethman H (2007) Human subtelomeric duplicon structure and organization. *Genome Biol* 8: R151.
11. Riethman H (2008) Human subtelomeric copy number variations. *Cytogenet Genome Res* 123: 244-252.
12. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, et al. (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18: 76-80.
13. Britt-Compton B, Rowson J, Locke M, Mackenzie I, Kipling D, et al. (2006) Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Hum Mol Genet* 15: 725-733.
14. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D (2003) Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 33:

203-207.

15. Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, et al. (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 6: 1305-1313.
16. Louis EJ (1995) The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 1553-1573.
17. McCarroll RM, Fangman WL (1988) Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell* 54: 505-513.
18. Kanoh J, Sadaie M, Urano T, Ishikawa F (2005) Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin independently of RNAi at telomeres. *Curr Biol* 15: 1808-1819.
19. Hartley PD, Madhani HD (2009) Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 137: 445-458.
20. Preti M, Ribeyre C, Pascali C, Bosio MC, Cortelazzi B, et al. (2010) The telomere-binding protein Tbf1 demarcates snoRNA gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 38: 614-620.
21. Wright JH, Gottschling DE, Zakian VA (1992) *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* 6: 197-210.
22. Murray AW, Szostak JW (1983) Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 305: 189-193.
23. Arnoult N, Schluth-Bolard C, Letessier A, Drascovic I, Bouarich-Bourimi R, et al. (2010) Replication timing of human telomeres is chromosome arm-specific, influenced by subtelomeric structures and connected to nuclear localization. *PLoS Genet* 6: e1000920.
24. Zou Y, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE, Cornforth MN (2004) Asynchronous replication timing of telomeres at opposite arms of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12928-12933.
25. Hirai Y, Masutomi K, Ishikawa F (2012) Kinetics of DNA replication and telomerase reaction at a single-seeded telomere in human cells. *Genes Cells* 17: 186-204.
26. Wright WE, Tesmer VM, Liao ML, Shay JW (1999) Normal human telomeres are not late replicating. *Exp Cell Res* 251: 492-499.
27. Zhao Y, Abreu E, Kim J, Stadler G, Eskiocak U, et al. (2011) Processive and

- distributive extension of human telomeres by telomerase under homeostatic and nonequilibrium conditions. *Mol Cell* 42: 297-307.
28. Verdun RE, Crabbe L, Haggblom C, Karlseder J (2005) Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. *Mol Cell* 20: 551-561.
 29. Verdun RE, Karlseder J (2006) The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127: 709-720.
 30. Strahl-Bolsinger S, Hecht A, Luo K, Grunstein M (1997) SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* 11: 83-93.
 31. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantseva L, Giulotto E, Lingner J (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318: 798-801.
 32. Schoeftner S, Blasco MA (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 10: 228-236.
 33. Flynn RL, Centore RC, O'Sullivan RJ, Rai R, Tse A, et al. (2011) TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature* 471: 532-536.
 34. Lopez de Silanes I, Stagno d'Alcontres M, Blasco MA (2010) TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat Commun* 1: 33.
 35. Davoli T, de Lange T (2012) Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* 21: 765-776.
 36. Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA (1999) Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol* 144: 589-601.
 37. Stewart SA, Weinberg RA (2000) Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 10: 399-406.
 38. Hackett JA, Greider CW (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 21: 619-626.
 39. DePinho RA (2000) The age of cancer. *Nature* 408: 248-254.

40. Benetti R, Garcia-Cao M, Blasco MA (2007) Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat Genet* 39: 243-250.
41. Blasco MA (2007) The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 8: 299-309.
42. Nergadze SG, Farnung BO, Wischnewski H, Khoriauli L, Vitelli V, et al. (2009) CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA* 15: 2186-2194.
43. Caslini C, Connelly JA, Serna A, Broccoli D, Hess JL (2009) MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. *Mol Cell Biol* 29: 4519-4526.
44. Arnoult N, Van Beneden A, Decottignies A (2012) Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha. *Nat Struct Mol Biol* 19: 948-956.
45. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM (2009) TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell* 35: 403-413.
46. Deng Z, Campbell AE, Lieberman PM (2010) TERRA, CpG methylation and telomere heterochromatin: lessons from ICF syndrome cells. *Cell Cycle* 9: 69-74.
47. Szostak JW, Blackburn EH (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245-255.
48. Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154-157.
49. Itzhaki JE, Barnett MA, MacCarthy AB, Buckle VJ, Brown WR, et al. (1992) Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA. *Nat Genet* 2: 283-287.
50. Barnett MA, Buckle VJ, Evans EP, Porter AC, Rout D, et al. (1993) Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucleic Acids Res* 21: 27-36.
51. Farr C, Fantes J, Goodfellow P, Cooke H (1991) Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7006-7010.

52. Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, et al. (2004) Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 280-290.
53. Schor SL, Johnson RT, Mullinger AM (1975) Perturbation of mammalian cell division. II. Studies on the isolation and characterization of human mini segregant cells. *J Cell Sci* 19: 281-303.
54. Johnson RT, Rao PN (1970) Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226: 717-722.
55. Ikeno M, Masumoto H, Okazaki T (1994) Distribution of CENP-B boxes reflected in CREST centromere antigenic sites on long-range alpha-satellite DNA arrays of human chromosome 21. *Hum Mol Genet* 3: 1245-1257.
56. Silahatoglu A, Pfundheller H, Koshkin A, Tommerup N, Kauppinen S (2004) LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenet Genome Res* 107: 32-37.
57. Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1991-1995.
58. Nakamura M, Nabetani A, Mizuno T, Hanaoka F, Ishikawa F (2005) Alterations of DNA and chromatin structures at telomeres and genetic instability in mouse cells defective in DNA polymerase alpha. *Mol Cell Biol* 25: 11073-11088.
59. Chapman RD, Heidemann M, Albert TK, Mailhammer R, Flatley A, et al. (2007) Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318: 1780-1782.
60. Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner J (2010) Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol* 30: 4808-4817.
61. Gottschling DE, Zakian VA (1986) Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* 47: 195-205.
62. Karnani N, Taylor C, Malhotra A, Dutta A (2007) Pan-S replication patterns and chromosomal domains defined by genome-tiling arrays of ENCODE genomic areas. *Genome Res* 17: 865-876.
63. Hiratani I, Gilbert DM (2009) Replication timing as an epigenetic mark. *Epigenetics* 4: 93-97.

64. Takai KK, Hooper S, Blackwood S, Gandhi R, de Lange T (2010) In vivo stoichiometry of shelterin components. *J Biol Chem* 285: 1457-1467.
65. Tommerup H, Dousmanis A, de Lange T (1994) Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* 14: 5777-5785.
66. Makarov VL, Lejnine S, Bedoyan J, Langmore JP (1993) Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* 73: 775-787.
67. Doksani Y, Wu JY, de Lange T, Zhuang X (2013) Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell* 155: 345-356.
68. Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, et al. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 59: 141-150.
69. Egloff S, Dienstbier M, Murphy S (2012) Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends Genet* 28: 333-341.
70. Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD (2002) Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1218-1222.
71. Gong XQ, Nedialkov YA, Burton ZF (2004) Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II. *J Biol Chem* 279: 27422-27427.
72. Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG, Rutter WJ (1970) Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science* 170: 447-449.
73. Baillat D, Hakimi MA, Naar AM, Shilatifard A, Cooch N, et al. (2005) Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* 123: 265-276.
74. Azzalin CM, Lingner J (2008) Telomeres: the silence is broken. *Cell Cycle* 7: 1161-1165.
75. Iglesias N, Redon S, Pfeiffer V, Dees M, Lingner J, et al. (2011) Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep* 12: 587-593.
76. Hecht A, Strahl-Bolsinger S, Grunstein M (1996) Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383: 92-96.
77. Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, et al. (2009)

- Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138: 90-103.
78. Linardopoulou EV, Parghi SS, Friedman C, Osborn GE, Parkhurst SM, et al. (2007) Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet* 3: e237.
 79. Cusanelli E, Romero CAP, Chartrand P (2013) Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Molecular Cell* 51: 780-791.
 80. Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 36: 94-99.
 81. Yehezkel S, Rebibo-Sabbah A, Segev Y, Tzukerman M, Shaked R, et al. (2011) Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics* 6: 63-75.
 82. Deng Z, Wang Z, Stong N, Plasschaert R, Moczan A, et al. (2012) A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J* 31: 4165-4178.
 83. Miller KM, Rog O, Cooper JP (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* 440: 824-828.
 84. Nishiyama A, Muraki K, Saito M, Ohsumi K, Kishimoto T, et al. (2006) Cell-cycle-dependent *Xenopus* TRF1 recruitment to telomere chromatin regulated by Polo-like kinase. *EMBO J* 25: 575-584.
 85. Dionne I, Wellinger RJ (1998) Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res* 26: 5365-5371.
 86. Gidoni D, Dynan WS, Tjian R (1984) Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature* 312: 409-413.
 87. Ishii K, Laemmli UK (2003) Structural and dynamic functions establish chromatin domains. *Mol Cell* 11: 237-248.
 88. Proudfoot N (1991) Poly(A) signals. *Cell* 64: 671-674.
 89. Nittis T, Guittat L, LeDuc RD, Dao B, Duxin JP, et al. (2010) Revealing novel telomere proteins using in vivo cross-linking, tandem affinity purification, and label-free quantitative LC-FTICR-MS. *Mol Cell Proteomics* 9: 1144-1156.

90. Giannone RJ, McDonald HW, Hurst GB, Shen RF, Wang Y, et al. (2010) The protein network surrounding the human telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and POT1. *PLoS One* 5: e12407.
91. Chinen M, Morita M, Fukumura K, Tani T (2010) Involvement of the spliceosomal U4 small nuclear RNA in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromeres. *J Biol Chem* 285: 5630-5638.
92. Bayne EH, Portoso M, Kagansky A, Kos-Braun IC, Urano T, et al. (2008) Splicing factors facilitate RNAi-directed silencing in fission yeast. *Science* 322: 602-606.
93. Guil S, Caceres JF (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 14: 591-596.

謝辞

本研究を支持してくださった、石川冬木教授の的確なご指導、細やかな励まし、並び多々のお力添えに心から感謝いたします。

本研究に必須のヒト人工染色体をもつ哺乳類細胞の作製にあたり、快くご支援とご助言をいただきました、鳥取大学の押村光雄先生、香月康宏先生、阿部智志博士に厚く御礼申し上げます。

学部学生の頃から、未熟な私を辛抱強く熱心に指導して下さった助教の鍋谷彰博士、多彩なアイデアと様々な視点、議論により私の研究を支えて下さった、齋藤基輝博士、平井悠吾博士に深く感謝いたします。

試薬作製等の実験の手助けをして下さった補佐員の田村美樹氏、技術専門職員の渡邊祐三氏、また、円滑な事務処理をしていただいた秘書の片山安希子氏、阪本真弓氏、佐々木睦氏、前川文氏、白淵愛依子氏、山崎恵莉子氏、そして日々の研究生活において様々にお世話になった石川研究室の皆様に、厚く御礼申し上げます。

最後に、私の精神的および経済的に多大な援助をして下さった私の両親に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Michihito Wakai, Satoshi Abe, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura and Fuyuki Ishikawa

A Human Artificial Chromosome Recapitulates the Metabolism of Native Telomeres in Mammalian Cells

PLoS One, in press, 2014